

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



Estudo imunohistoquímico da expressão da micróglia nos tumores gliais

Mafalda Lobo da Costa Girão Marques

Mestrado em Neurociências

Lisboa, 2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



Estudo imunohistoquímico da expressão da micróglia nos tumores gliais

Mafalda Lobo da Costa Girão Marques

Orientador: Professor Doutor José Pimentel, Laboratório de Neuropatologia do Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE - Hospital de Santa Maria (CHLN - HSM)

Co-Orientadora: Mestre Ana Rita Silvestre, Laboratório de Neuropatologia do Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE - Hospital de Santa Maria (CHLN - HSM)

Mestrado em Neurociências

Lisboa, 2014

Todas as afirmações contidas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do candidato, não cabendo à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa qualquer responsabilidade.

Esta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de 18 de Março de 2014.

“Aqueles que se sentem satisfeitos, sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do Mundo”

Walter Savage Landor

Dedicatória

Ao meu querido Avô Fernando.

Agradecimentos

Ao Professor José Pimentel, por ter aceitado ser meu orientador, pelo carinho com que me recebeu no seu laboratório, pela confiança que depositou em mim e por todos os conhecimentos que me transmitiu.

À Rita, minha co-orientadora, por toda a sua orientação, atenção, disponibilidade, paciência, segurança e sentido de responsabilidade que me inculuiu.

Aos meus Pais, por serem o meu exemplo e orgulho, por acreditarem em mim e por me apoiarem acima de tudo.

À minha irmã Margarida pela cumplicidade e apoio únicos.

À minha amiga Vera por ser a amiga incansável de todas as horas, boas ou menos boas.

Ao meu amigo Francisco pelo seu apoio e distrações que me ajudaram a descontraír quando era preciso.

Às minhas amigas e colegas Ângela, Inês, Joana, Noémia e Sofia, por terem estado sempre presentes, cada uma à sua maneira.

Ao Mestre Pedro Pereira pela pronta disponibilidade que teve sempre, inclusivamente no tratamento estatístico dos dados.

A todos os Profissionais do Laboratório de Neuropatologia pela troca de ideias e bom ambiente que favoreceu a conclusão deste trabalho.

Ao meu primo Duarte e ao meu amigo Filipe pelas ajudas, indicações e sugestões para a escrita da tese.

À Dr^a Vânia por toda a orientação indispensável ao alcance e concretização desta etapa importante.

Às Secretárias do Instituto de Farmacologia e Neurociências do Instituto de Medicina Molecular, Alexandra Botelho e Cristina Varandas, por todas as ajudas incansáveis.

Índice

Lista de abreviaturas	ix
Resumo	xii
Abstract	xiii
Lista de figuras	xiv
Lista da tabelas	xvi
Lista de gráficos.....	xvii
I. Introdução	1
1. Elementos celulares do Sistema Nervoso Central.....	1
1.1. Neurónios	2
1.2. Células da glia	3
2. Micróglia	8
2.1. Origem.....	8
2.2. Identificação	12
2.3. Papel no SNC normal	17
2.4. Papel em diferentes patologias	19
3. Tumores gliais	22
3.1. Tumores do Sistema Nervoso	22
3.2. Classificação dos tumores gliais	23
3.3. Epidemiologia dos tumores gliais	25
3.4. Astrocitomas.....	27
3.5. Oligodendrogliomas	28
3.6. Ependimomas	30
4. Acção da micróglia nos tumores gliais	32
4.1. Papel potenciador do crescimento tumoral	34
4.2. Papel supressor do crescimento tumoral	38
4.3. Potencial terapêutico da micróglia	39
II. Objectivos do estudo	43
1. Objectivo geral	43
2. Objectivos específicos.....	44
III. Amostra e metodologia.....	45
1. Selecção da amostra	45
2. Caracterização da amostra.....	46
3. Procedimento laboratorial	50
3.1. Técnica de coloração de Hematoxilina & Eosina	51
3.2. Técnica de imunohistoquímica.....	52
4. Análise microscópica	58
5. Análise estatística	59

IV. Resultados.....	61
1. Expressão da micróglia nas zonas em estudo.....	62
2. Comparação da expressão da micróglia entre os tumores gliais em estudo e os grupos de controlo.....	67
2.1. Tumores gliais vs. Controlos normais.....	68
2.2. Tumores gliais vs. Controlos tumorais.....	69
2.3. Astrocitomas vs. Oligodendrogliomas	71
3. Comparação entre as marcações imunohistoquímicas	74
V. Discussão	77
VI. Conclusão e perspectivas futuras	91
VII. Bibliografia	93
VIII. Anexos	103
Anexo 1. Dados clínicos referentes aos casos da amostra.	103
Anexo 2. Dados clínicos referentes aos controlos da amostra.	107

Lista de abreviaturas

Ac – Anticorpo/s

Ag – Antigénio/s

AIF-1 – *Allograft Inflammatory Factor-1*

APC – *Antigen Presenting Cells*

BHE – Barreira Hematoencefálica

BSA – *Bovine Serum Albumin*

CD – *Cluster of Differentiation*

CHLN- HSM – Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE – Hospital de Santa Maria

CX₃CL1 – Ligando da quimiocina CX₃C

CX₃CR1 – Receptor 1 da quimiocina CX₃C

DA – Doença de Alzheimer

DAB – 3,3'- diaminobenzidina

DHp – *Definitive Hematopoiesis*

DP – Doença de Parkinson

EHp – *Embryonary Hematopoiesis*

EGF – *Epidermal Growth Factor*

ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica

EM – Esclerose Múltipla

EUA – Estados Unidos da América

GBM – Glioblastoma multiforme

GFAP – *Glial Fibrillar Acid Protein*

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

H&E – Coloração de Hematoxilina e Eosina

HAND – *HIV-Associated Neuropsychiatric Disorders*

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

HLA – *Human Leukocyte Antigen*

HRP – *HorseRadish Peroxidases*

IBA-1 – *Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1*

IL – Interleucina/s

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LN – Laboratório de Neuropatologia

mRNA – *Messenger Ribonucleic acid*

M1 – Ativação clássica da micróglia

M2 – Ativação alternativa da micróglia

MG/MC – População Micróglia/ Macrófagos

MHC II - *Major Histocompatibility Complex - class II*

MMP – *Matrix Metalloproteases*

NGF – *Nerve Growth Factor*

NK - *Natural Killers*

NO – *Nitric Oxide*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAMP – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

PGE2 – Prostaglandina/s E2

PRR – *Pathogen Recognition Receptors*

ROS – *Reactive Oxygen Species*

SB – Substância Branca

SC – Substância Cinzenta

SN – Sistema Nervoso

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TGF- β – *Transforming Growth Factor- β*

TLR – *Toll-Like Receptors*

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor- α*

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*

ZI – Zona de Invasão

ZN – Zona Normal

ZT – Zona Tumoral

β A – Péptido β -Amilóide

Resumo

Introdução: A micróglia, conhecida como as células imunitárias do Sistema Nervoso Central (SNC), compõem, com os astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais, as células da glia. É comumente designada de população de macrófagos (MG/MC) especializados, com capacidade de alterar a sua morfologia e funcionalidade em resposta às diversas patologias, incluindo os tumores gliais. Estes constituem 30% do total dos tumores do SNC e 80% são malignos. As células da micróglia têm sido descritas como existentes no “microambiente” dos gliomas, apesar do seu papel ser controverso.

Objetivo: Avaliação imunohistoquímica da expressão da micróglia nos tumores gliais, descrevendo a sua distribuição em três zonas do “microambiente tumoral” (Zona Normal-ZN, Zona de Invasão-ZI e Zona Tumoral-ZT) e comparação com controlos tumorais e normais. Identificação do melhor anticorpo (Ac) para a micróglia.

Metodologia: Inclusão de 40 astrocitomas, 20 oligodendrogliomas e 20 ependimomas. Como controlos tumorais, 10 metástases, 13 meduloblastomas e 14 hemangioblastomas, e como controlos normais 15 amostras de casos de cirurgia de epilepsia. A identificação imunohistoquímica da micróglia foi realizada com três Ac distintos, anti-CD68, anti-MHC II, e anti-IBA-1. A expressão quantitativa da micróglia foi feita com recurso ao *software* ImageJ.

Resultados: A expressão da micróglia foi superior nos tumores gliais comparativamente a outros do SNC. Os astrocitomas foram os gliomas com maior expressão de micróglia. Houve diferenças entre as ZT dos astrocitomas de baixo e alto grau, para os três Ac (anti-CD68: $p = 0.007$; anti-MHC II: $p = 0.002$; anti-IBA-1: $p = 0.016$). A ZN foi a que teve menor expressão microglial e o Ac anti-IBA-1, o com menor marcação celular.

Conclusão: O comportamento da micróglia difere entre tipos de gliomas, bem como entre graus de anaplasia. O possível papel “potenciador” ou “supressor” da micróglia permanece por clarificar, no entanto parece haver uma acção imunossupressora das células tumorais sobre a mesma.

Palavras-chave: Imunohistoquímica; Macrófagos; Micróglia; MG/MC; Tumores gliais.

Abstract

Introduction: Microglia are the immune cells of Central Nervous System (CNS) and, along with astrocytes, oligodendrocytes, and ependymal cells, they comprise glial cells. Microglia are often classified as specialized macrophages (MG/MC) with ability to change its morphology and function in response to several pathologies including gliomas. They comprise 30% of all CNS tumors being 80% of these malignant. Microglia have been described as present in the glioma “microenvironment” although its role remains controversial.

Aim: Immunohistochemical evaluation of microglia expression in glial tumors with description of its distribution in three areas of the “tumoral microenvironment” (normal parenchyma; invasion parenchyma; tumor core) and comparasions with tumor and normal controls. Identification of the best antibody for microglia.

Methodology: Inclusion of 40 astrocytomas, 20 oligodendrogliomas and 20 ependymomas as cases. As tumor controls were included 10 metastasis, 13 medulloblastomas and 14 hemangioblastomas and as normal controls 15 samples of epilepsy surgery. The immunohistochemical identification of microglia was achieved with three distinct antibodies (anti-CD68, anti-MHC II and anti-IBA-1). Microglia quantitative expression of microglia was perfomed with software ImageJ.

Results: Microglia expression was higher in glial tumors as compared to other CNS tumors. Astrocytomas were the gliomas with the highest expression of microglia. There were differences between ZT of the low and high grade astrocytomas, with the three antibodies (anti-CD68: $p = 0.007$; anti-MHC II: $p = 0.002$; anti-IBA-1: $p = 0.016$). The ZN had the lowest expression and the antibody anti-IBA-1 had the lowest cellular labeling.

Conclusion: The behavior of microglia changes between different types of gliomas as well as between degree of anaplasia. The possible "enhancer" or "suppressor" role of microglia remains unclear, however, these cells appears to be immunosuppressed by tumor cells.

Key-words: Immunohistochemistry; Macrophages; Microglia; MG/MC; Glial tumors.

Lista de figuras

Figura 1. Relação entre as células da glia (astrócitos, oligodendrócitos, células ependimárias e micróglia) e os outros componentes celulares do SNC (neurónios e células dos vasos sanguíneos)	3
Figura 2. Fotografia de Pío del Río Horteiga (A); Células da micróglia desenhadas por Pío del Río-Hortega (B); Microfotografias de células da micróglia com morfologia ramificada (C) e amebóide (D)	9
Figura 3. Origem embrionária das células da micróglia a partir da linha hematopoiética, contrastando com a origem neuroectodérmica das restantes células do SNC	11
Figura 4. Desenvolvimento cerebral e homeostasia da população microglial	12
Figura 5. Vários tipos de macrófagos do SNC e a micróglia	14
Figura 6. Micróglia no <i>steady-state</i> com morfologia ramificada e fenótipo residente	19
Figura 7. Activação clássica da micróglia (M1)	20
Figura 8. Cortes histológicos de H&E de um GBM	24
Figura 9. Esquema representativo de algumas das células constituintes do “microambiente tumoral”	32
Figura 10. Activação alternativa (M2) da micróglia por interacção das células do tumor glial, as quais secretam factores de crescimento e IL	36
Figura 11. Lâminas de H&E seleccionadas na primeira fase do trabalho	45
Figura 12. Blocos histológicos (A); Exemplo de um bloco histológico e lâmina correspondente de uma biopsia (B) e de uma peça cirúrgica (C)	46
Figura 13. Sequência de corte dos blocos histológicos	51
Figura 14. Sequência de desparafinação das lâminas, desde a solução de xilol, na hotte, até à sua total hidratação	52
Figura 15. Esquema da fase de inibição da peroxidase endógena	53
Figura 16. Esquema da fase de recuperação antigénica	54

Figura 17. Desenhos ilustrativos dos métodos do polímero indirecto <i>EnVision</i> [®] (A) e do polímero indirecto <i>NovoLink</i> [®] (B).	57
Figura 18. Fotografias de três marcações imunohistoquímicas distintas do trabalho	58
Figura 19. Fotografias das três zonas de estudo em cada marcação imunohistoquímica de um GBM	59
Figura 20. Expressão da micróglia com o Ac anti-MHC II nas ZN (A), ZI (B) e ZT (C) de um GBM incluído na amostra	67
Figura 21. Fotografias da expressão da micróglia com as três marcações imunohistoquímicas entre a ZN de um astrocitoma difuso (A, B e C) e de um de cirurgia de epilepsia (D, E e F), e entre a ZT de um ependimoma anaplásico (G, H e I) e de uma metástase (J, L e M)	73
Figura 22. Fotografias da expressão da micróglia nas três zonas tumorais consideradas	75

Lista da tabelas

Tabela 1. Tabela-resumo dos tipos de células da glia	7
Tabela 2. Principais características de três tipos de gliomas (astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas)	26
Tabela 3. Principais características histológicas dos astrocitomas	29
Tabela 4. Principais características histológicas dos oligodendrogliomas (grau II e III)	30
Tabela 5. Principais características histológicas dos ependimomas (grau II e III)	31
Tabela 6. Constituição da amostra dos casos em estudo: tamanho da amostra e sua divisão por tipo, sub-tipo e grau de anaplasia do tumor glial	47
Tabela 7. Constituição da amostra controle: tamanho da amostra e divisão por tipo e sub-tipo de tecido.	48
Tabela 8. Caracterização da amostra: intervalo de idades e média de idades (anos), e frequência de gênero de cada grupo do estudo	49
Tabela 9. Caracterização dos Ac primários utilizados no estudo	55
Tabela 10. Técnica imunohistoquímica	55
Tabela 11. Expressão da micróglia com cada Ac utilizado, e nas três zonas consideradas para o grupo de estudo e para os casos de controle	61
Tabela 12. Significâncias estatísticas ocorridas nos astrocitomas e nos oligodendrogliomas relativas às comparações da expressão da micróglia de cada zona e para os três Ac	64
Tabela 13. Percentagens relativas da expressão da micróglia nos oligodendrogliomas de baixo e de alto grau de anaplasia, com os três Ac e em cada uma das três zonas consideradas	67

Lista de gráficos

Gráfico 1. Expressão da micróglia no conjunto dos tumores gliais e nas três zonas estudadas	63
Gráfico 2. Expressão da micróglia nos astrocitomas de baixo (A, B e C) e alto grau (D, E e F)	66
Gráfico 3. Expressão dos três Ac da micróglia na ZN dos tumores gliais em estudo e nos controlos normais	68
Gráfico 4. Expressão dos três Ac da micróglia na ZT dos tumores gliais em estudo e nos controlos tumorais	70
Gráfico 5. Comparação da expressão da micróglia entre os astrocitomas e os oligodendrogliomas nas diferentes zonas e para os três Ac utilizados	72
Gráfico 6. Expressão dos três Ac para a micróglia em cada uma das zonas da amostra em estudo e de controlo	75

I. Introdução

1. Elementos celulares do Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso (SN) é dividido em sistema nervoso periférico (SNP) e sistema nervoso central (SNC). Apesar de anatomicamente separadas, ambas as divisões estão funcionalmente integradas. O SNP é composto por dois componentes: o somático e o vegetativo (autonómico) ⁵⁵.

O SNC consiste no encéfalo e na medula espinhal, e é constituído por três tipos de células: os neurónios (termo introduzido por Heinrich Wilhelm von Waldeyer¹⁰²), as células da glia e as células dos vasos sanguíneos⁹⁰. Os neurónios são as unidades básicas do SNC, na ordem dos 10^{11} , associados a mais de 10^{12} células da glia^{29,31}. Desempenham funções de neurotransmissão dos diversos estímulos nervosos e as células da glia, entre muitas outras importantes, as de suporte²⁹.

A distinção entre os elementos celulares do SNC é influenciada pela sua ontogenia e, para tal, é necessário conhecer a respectiva embriogénese. As células da ectoderme formam a placa neural – na direcção ântero-posterior – e, ventralmente, originam o sulco neural, fechando-se num tubo, o tubo neural. Inicialmente, a parede deste consiste apenas numa camada de células – células neuroepiteliais –, que depois assume uma composição pseudo-estratificada, a partir das quais se originam os neuroblastos e os glioblastos. Estes elementos indiferenciados irão migrar para a superfície do tubo formando as células das três camadas do tubo neural: o epitélio dos plexos coróides, a substância cinzenta (SC) e a substância branca (SB) do SNC. A parte lateral da placa neural forma a crista neural, que originará os elementos

do SNP, entre os quais as células ganglionares espinhais, as ganglionares autonómicas e as células de Schwann^{31,83}.

Os neurónios desenvolvem-se a partir dos neuroblastos e as células da glia primitivas são os glioblastos, a partir dos quais se originam os astrócitos e os oligodendrócitos. As últimas a formar-se são as células endimárias, que permanecem internamente e revestem as cavidades ventriculares^{31,83}.

Em contraste com as outras células da glia, as células da micróglia possuem uma origem embrionária a partir da mesoderme^{37,90}.

1.1. Neurónios

Desde Ramón y Cajal¹⁰² que os neurónios são apontados como os principais elementos estruturais e funcionais do SN. Articulam-se numa complexa rede transmissora de informação sensitiva, sensorial e motora, entre outras, comunicando entre si e com células efectoras, nomeadamente as da glia^{10,55}.

Apesar de variarem no tamanho e na forma consoante as zonas do SN, os neurónios possuem todos a mesma estrutura básica composta pelo corpo celular, dendrites (baptizadas por Wilhelm His¹⁰²) e axónios (nome dado por Alfred Kölliker¹⁰²). Por exemplo, no hipocampo existem neurónios piramidais e no cerebelo as células de Purkinje, cuja estrutura básica (corpo celular, dendrites e axónio) é a mesma^{10,55}.

No corpo celular, “centro metabólico” do neurónio, localiza-se o núcleo e a maioria das estruturas citoplasmáticas, importantes para a síntese proteica neuronal^{10,55}.

As dendrites são projecções relativamente curtas e altamente ramificadas que emergem dos corpos celulares, recebendo e transmitindo os impulsos nervosos, constituindo locais preferenciais de contacto pós-sináptico com axónios de outros neurónios^{10,55}.

Cada neurónio possui um prolongamento cilíndrico (até 1 metro de comprimento), denominado axónio, originado do cone de implantação do corpo celular e que termina noutros neurónios, ou órgãos efectores, através de um número variável de botões terminais. Os axónios revestidos pela membrana de mielina, ou seja, mielinizados, perdem-na na porção distal e interrompem-na ao longo da sua extensão, em pontos regulares designados nódulos de Ranvier. O revestimento de mielina permite um aumento considerável da velocidade de condução dos impulsos nervosos, função primária dos axónios^{10,55}.

1.2. Células da glia

Paralelamente aos neurónios, as células da glia são também importantes elementos celulares do SNC. Deste grupo fazem parte os astrócitos, os oligodendrócitos, as células ependimárias e a micróglia. Todos interagem entre si, bem como com os neurónios e vasos sanguíneos (Figura 1)^{31,55}.

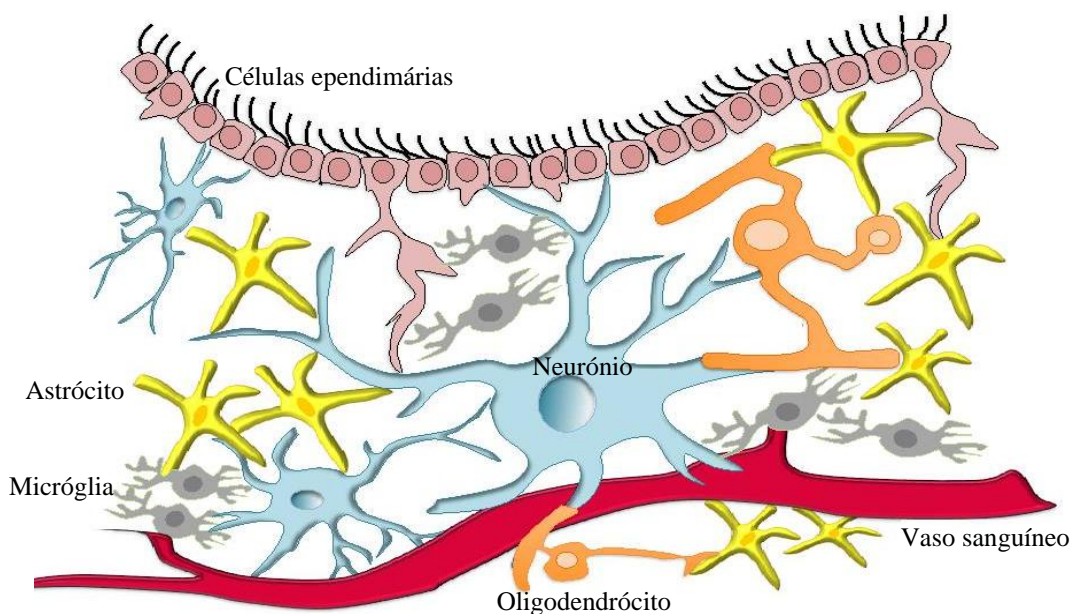


Figura 1. Relação entre as células da glia (astrócitos, oligodendrócitos, células ependimárias e micróglia) e os outros componentes celulares do SNC (neurónios e células dos vasos sanguíneos). Adaptada de Medicina Geriátrica (2013)⁶⁹.

Quando as células da glia foram descritas pela primeira vez, em 1824³⁸, julgava-se que actuariam como elementos conectivos que separavam os neurónios em *clusters*, no encéfalo, na medula espinhal e nos nervos. Mais tarde, em 1856, Rudolf Virchow denominou esta população de “células de glia”³⁸, do inglês *glue* (cola)².

As interacções entre os neurónios e as células da glia são importantes para o desenvolvimento e manutenção das funções e estruturas do SN, bem como para a sua neuroprotecção. Contribuem ainda para a capacidade reparadora do SN e podem participar na sua deterioração devido à perda neuronal associada ao envelhecimento ou a diferentes patologias, denominadas “degenerativas”, como é o caso das doenças de Parkinson (DP) e Alzheimer (DA) e a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)^{2,25}.

As células da glia são também responsáveis pelo suplemento de nutrientes e oxigénio, e pela destruição e remoção das células mortas. A inexistência de prolongamentos celulares que comuniquem com os órgãos sensoriais e efectores, faz destes elementos uma população essencialmente protectora e de suporte, contrastando com a função de neurotransmissão desempenhada pelos neurónios^{2,25}.

1.2.1. Astrócitos

Os astrócitos são as células da glia mais abundantes do SNC²¹. Genericamente em forma de estrela, existem maioritariamente sob três formas: astrócitos protoplasmáticos (na SC), astrócitos fibrilares (na SB) e astrócitos radiais (no cerebelo adulto, retina e parede dos ventrículos)^{83,101}. Deles depende o suporte metabólico e funcional, tal como a migração neuronal aquando da embriogénese, por intermédio da denominada glia radial^{2,55}.

Expressam inúmeros receptores de neurotransmissores, factores de crescimento e citocinas, permitindo-lhes induzir, estabilizar e modular a actividade sináptica do SNC. Estão

envolvidos, ainda, no desenvolvimento embrionário, na manutenção do encéfalo “normal” e em grande parte das lesões cerebrais. Neste último caso, tornam-se activados e adquirem uma morfologia hipertrófica, aumentando a produção do seu filamento intermediário, *Glial Fibrillar Acid Protein* (GFAP) ¹⁰¹.

1.2.2. Oligodendrócitos

A designação “oligodendrócito” é atribuída a Pío del Río de Horteiga que, em 1921, a usou para designar as “células da glia com poucas ramificações”. O facto de serem mais pequenos e possuírem uma densidade nuclear e citoplasmática superior à dos astrócitos constitui uma forma de distingui-los^{25,26}. Deles depende a produção de mielina para os axónios com origem no SNC^{2,55}.

Normalmente os seus prolongamentos contactam com a superfície dos neurónios, formando expansões fundamentais para a formação da bainha de mielina em torno dos axónios centrais. Esta bainha consiste num conjunto de camadas isolantes que envolvem os axónios e é essencial para a condução normal dos impulsos nervosos^{25,26}.

Tal como as outras células da glia, os oligodendrócitos expressam marcadores específicos, tais como a galactocerebrósido, a anidrase carbónica II, a proteína básica da mielina e a glicoproteína associada à mielina^{25,26}.

1.2.3. Células Ependimárias

Estes elementos compõem um epitélio ciliado – o epêndima – que reveste as superfícies ventriculares do SNC, estendendo-se pela medula espinhal onde reveste o canal ependimário^{20,26}.

Caracterizam-se por uma forma cubóide-colunar com núcleos redondos. A sua superfície é coberta por microvilosidades e a maioria das células possui, à superfície, longos cílios. Estes prolongamentos permitem o contacto directo com outras células da glia do tecido adjacente. Em condições normais, também contactam com células fagocitárias (macrófagos) residentes na superfície ventricular. No entanto, em situações de lesão, o epêndima pode atrofiar-se e ser invadido por macrófagos provenientes dos vasos^{20,26}.

O epêndima adulto possui características estruturais e enzimáticas necessárias para remover uma grande variedade de moléculas prejudiciais ao encéfalo presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR). Fá-lo de forma a manter estáveis as condições homeostáticas do LCR, desempenhando, por isso, funções de alerta^{20,26}.

1.2.4. Células da Micróglia

As células da micróglia são elementos de pequenas dimensões presentes no encéfalo e na medula espinhal e, em contraste com as outras células da glia, têm origem mesodérmica, derivando da linha hematopoiética. Representam cerca de 5 a 20% de todos os elementos gliais^{37,95}.

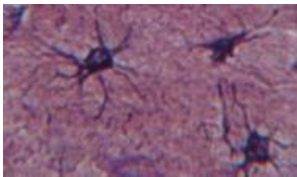

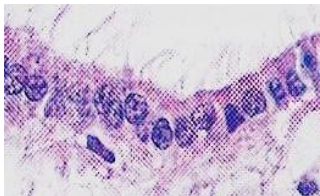

É considerada o “sensor patológico” do SNC¹⁷ com papel preponderante na manutenção das condições de homeostasia normais, através da detecção de alterações no ambiente envolvente^{43,56,65}. Assim, apresentam capacidade de “leitura” constante e modificam-se morfológica e funcionalmente na presença de perturbações homeostáticas nesse ambiente^{37,65}.

São também as células da glia mais plásticas, alternando a morfologia consoante o estadio de activação³⁷. Em condições patológicas, a micróglia é activada a fim de

desempenhar as suas funções imunitárias^{37,95}. Porém, o seu papel completo continua alvo de numerosas conjecturas.

Esta população celular é o objecto de estudo deste trabalho, pelo que será desenvolvido mais detalhadamente.

Tabela 1. Tabela - resumo dos tipos de células da glia¹⁰.

Células da Glia	Principais características	Imagem
Astrócitos	Células ramificadas em forma de estrela; Fornecem suporte mecânico aos neurónios; Importantes na reparação do tecido do SNC após uma lesão; Expressão de GFAP.	 Coloração: Método de Cajal. Ampliação: 400X
Oligodendrócitos	Células pouco ramificadas e envolvidas na mielinização dos neurónios centrais; Equivalentes às células de Schwann no SNP.	 Coloração: H&E. Ampliação: 480X
Células endoteliais	Formam um epitélio simples especializado que reveste os ventrículos cerebrais e o canal da água; Possuem cílios envolvidos na propulsão e manutenção da homeostasia do LCR.	 Coloração: H&E. Ampliação: 400X
Células da micróglia	Células de pequenas dimensões e de origem mesodérmica; Apresentam funções de defesa e imunitárias; Em resposta a uma lesão, transformam-se em células amebóides e adquirem uma função fagocitária.	 Imunohistoquímica: Ac anti-IBA-1. Ampliação: n.d. ¹⁰⁰

*Ac – Anticorpo/s; **GFAP** – *Glial Fibrillar Acid Protein*; **H&E** – Coloração de Hematoxilina e Eosina; **IBA-1** – *Ionized calcium-Binding Adaptor molecule -1*; **LCR** – Líquido Cefalorraquidiano; **SNC** – Sistema Nervoso Central; **SNP** – Sistema Nervoso Periférico. + **n.d.** - não disponível.

2. Micróglia

A micróglia, comumente referida como a população de macrófagos especializados do SNC, representa as células do sistema mononuclear fagocitário no SNC⁷ que migram e proliferam na presença de uma lesão^{33,83}. Normalmente, distribui-se equilibradamente por todo o encéfalo e medula espinhal³³.

A densidade e a morfologia da micróglia são específicas da região em que se localiza, estando presente em maior proporção na SC do que na SB⁸⁷. Em relação à morfologia, na SC, a micróglia possui uma morfologia radial, na SB apresenta prolongamentos longitudinais e em zonas cerebrais sem contacto com a barreira hematoencefálica (BHE), designa-se de micróglia “compacta”⁴².

Ao contrário das outras células da glia, originárias das células neuroepiteliais primitivas, a micróglia deriva das células do sistema imunitário^{3,13,91}. Uma pequena percentagem existe habitualmente no SNC – a chamada micróglia “residente”. O *turnover* destas células, em condições normais, é muito baixo e, como consequência, permanecem no encéfalo como população permanente^{106,107,108}.

Em qualquer situação patológica, as células da micróglia respondem ao estímulo desencadeado por factores de crescimento e por várias citocinas, como sejam as interleucinas (IL), de modo a desempenhar as suas funções inflamatórias e imunitárias^{46,108,109}.

2.1. Origem

Inicialmente, a micróglia foi englobada nas células da glia, fazendo parte da neuróglia (conceito introduzido por Rudolf Virchow¹⁰²), não sendo, deste modo, identificada como uma entidade celular isolada. Esta situação deveu-se ao facto de a micróglia, no seu estado

activado, ter um fenótipo semelhante às restantes células da glia, não sendo possível diferenciá-la⁵⁶.

Foi descrita, pela primeira vez, em 1899, por Nissl, como entidade celular distinta, sendo denominada *Staebchenzellen*, ou *rod cells*, face à forma dos seus núcleos^{56,107}. Nissl considerou-a como “glia reactiva”, uma vez que apresentava capacidade de migração e de fagocitose^{56,90}.

Em 1913, Cajal descreveu a micróglia como o “terceiro elemento” do SNC, termo aplicado a todas as células que fossem morfológicamente diferentes dos neurónios, “primeiro elemento” e dos astrócitos, “segundo elemento”. Neste “terceiro elemento” incluíam-se também os oligodendrócitos^{23,90}.

Após ter dado inicialmente o nome de “microgliócito” à micróglia^{56,102}, Pío del Río-Hortega separou-a dos oligodendrócitos, isolando-a no referido “terceiro elemento” (Figura 2). Os oligodendrócitos foram, então, incluídos no “segundo elemento”, partilhado com os astrócitos³². Em 1932, introduziu o termo “micróglia”⁵⁶ e, devido a isso, alguns autores referiam-se às células da micróglia como “células de Hortega”^{23,56}.

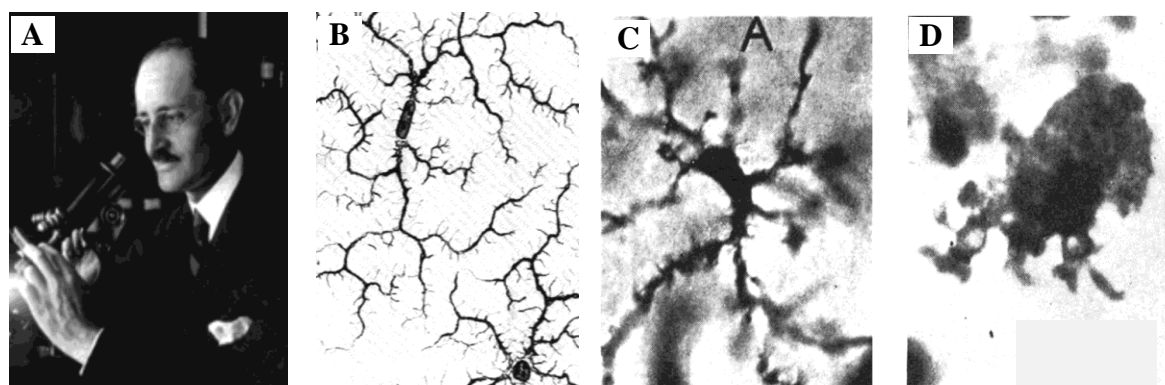


Figura 2. Fotografia de Pío del Río-Hortega (A); Células da micróglia desenhadas por Pío del Río-Hortega (B); Microfotografias de células da micróglia com morfologia ramificada (C) e amebóide (D)⁵⁶.

Recorrendo a técnicas de impregnação de prata, Pío del Río-Hortega caracterizou a micróglia como a única célula do SNC com um corpo celular alongado e prolongamentos a estenderem-se de ambos os pólos da célula, a denominada “micróglia ramificada”. Após um evento patológico a micróglia activar-se-ia, adquirindo a morfologia amebóide com capacidade de migrar, proliferar e fagocitar^{7,56}.

Inicialmente tomada como originária da ectoderme, foi Pío del Río-Hortega que a apontou como um elemento mesodérmico do SNC^{23,56}. Por intermédio de trabalhos em encéfalos de animais, postulou que a micróglia originar-se-ia de “corpúsculos embrionários” que migrariam da pia-máter para o encéfalo durante o desenvolvimento. Afirmou ainda que a sua origem seria de células mononucleares com capacidade de se transformarem em macrófagos²³.

A micróglia apresenta características distintas em relação aos restantes constituintes do SNC, uma vez que é o único componente cuja origem embrionária é mesodérmica¹² partilhada com as células da linha hematopoiética, incluindo os linfócitos, os eritrócitos, as plaquetas, os leucócitos, as células dendríticas e os macrófagos residentes do SNC (macrófagos dos plexos coróides, meningoteliais e perivascularres)⁹⁰ (Figura 3).

Porém, um dos grandes desafios tem sido a definição do seu progenitor embrionário. A hipótese actualmente mais aceite indica que os seus precursores serão as células com potencial eritróide e mielóide (células eritromielóides) do saco vitelino, que existem apenas no embrião e têm competência para originar, por um lado, células sanguíneas (eritrócitos) e, por outro, células precursoras dos macrófagos^{32,73}.

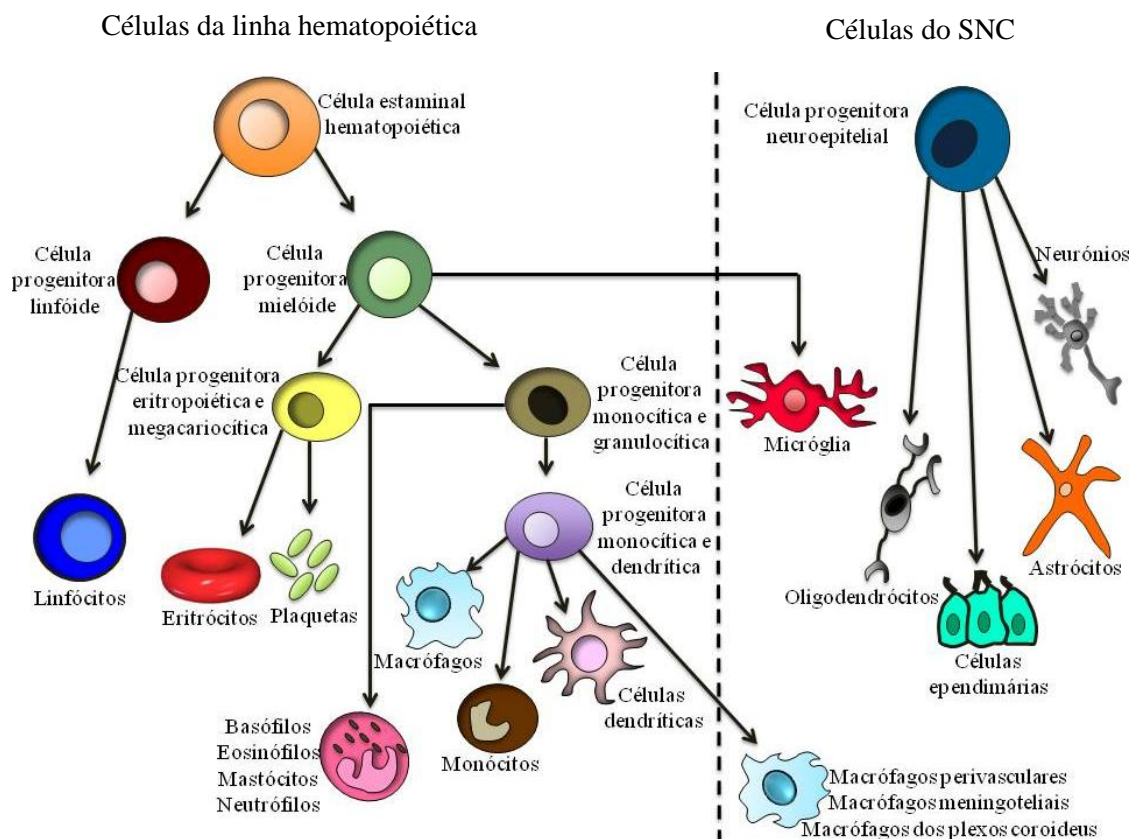


Figura 3. Origem embrionária das células da micróglia a partir da linha hematopoiética, contrastando com a origem neuroectodérmica das restantes células do SNC. Adaptada de Ransohoff, R. M. (2010) ⁹⁰.

As últimas invadiriam a neuroectoderme do encéfalo imaturo durante a hematopoiese embrionária (*Embryonic Hematopoiesis* – EHp), originando a micróglia, que se manteria como população celular definitiva e autónoma durante a idade adulta^{12,73}. Sob condições normais, homeostáticas, a micróglia forma uma população estável e independente que faz parte do parênquima encefálico. Este processo termina sob condições patológicas, quando se desenvolve o processo de hematopoiese definitiva (*Definitive Hematopoiesis* – DHp)⁷³. Esta ocorre na medula óssea durante toda a vida e é a partir desta que se originarão, por exemplo, as células dendríticas, os monócitos circulantes e os macrófagos perivasculares^{32,73} (Figura 4).

Em condições patológicas, o recrutamento dos monócitos e de outros progenitores derivados da medula óssea complementam a população microglial presente no encéfalo. No entanto, desconhece-se se persistirão e tornarão integrantes da rede microglial ou se são elementos temporários da população endógena^{12,33}.

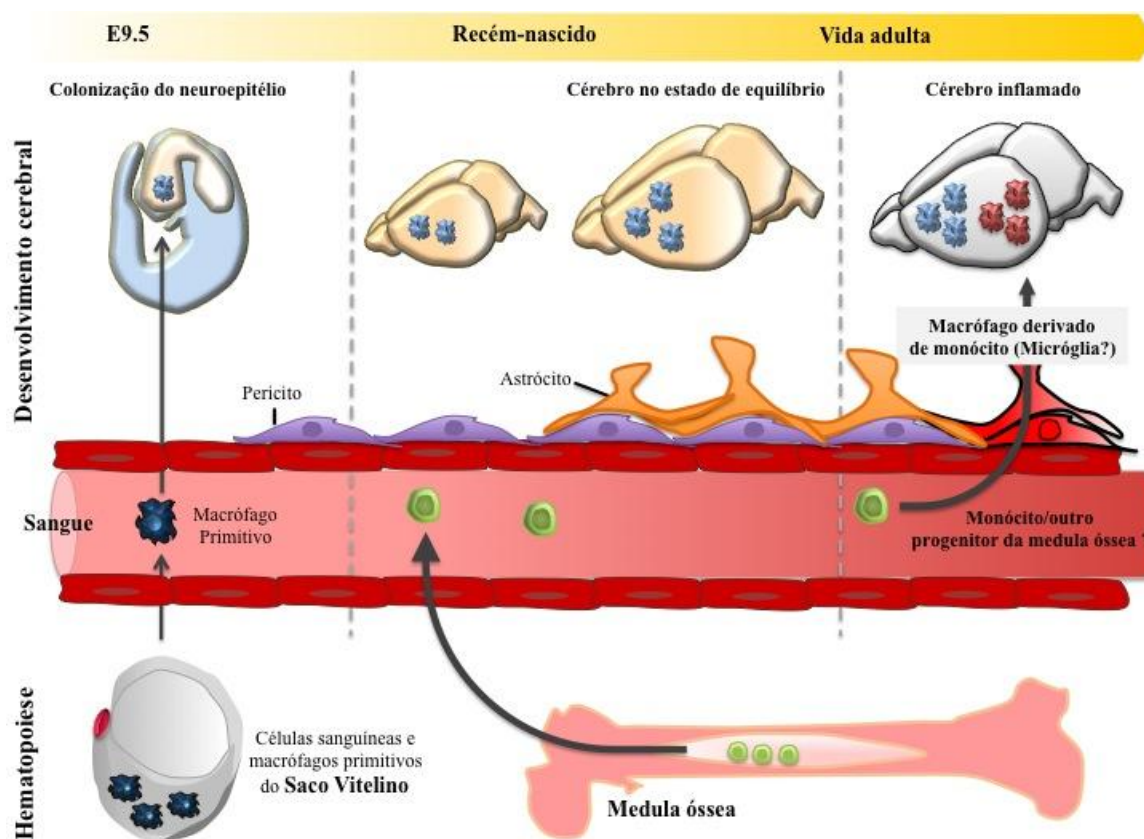


Figura 4. Desenvolvimento cerebral e homeostasia da população microglial. Os macrófagos primitivos deixam os *clusters* de células sanguíneas primitivas existentes no saco vitelino, entram na circulação sanguínea e colonizam o neuroepitélio ao dia embrionário E9.5, originando a micróglia. Adaptado de Ginhoux, F. *et al* (2013)³³.

2.2. Identificação

A micróglia tem uma morfologia distinta quando comparada com os macrófagos presentes noutros tecidos. Tipicamente, tem muitos prolongamentos finos e curtos permitindo uma elevada área de contacto com o meio circundante, de forma a poder monitorizar as suas

alterações. Esta morfologia é designada de “ramificada”, reflectindo o estado residente da micróglia⁷.

Por outro lado, em condições de fagocitose, face a uma lesão do SNC, adquirem uma morfologia semelhante à dos macrófagos, esférica e sem prolongamentos, contendo numerosos vacúolos fagocitários passando, então, a designar-se “micróglia activada” ou “micróglia amebóide”⁷.

Os macrófagos estão distribuídos por todo o organismo, genericamente classificados como macrófagos tecidulares e circulantes, e estão envolvidos na resposta imunitária perante lesões. No SNC estão presentes, habitualmente, vários tipos de macrófagos em diferentes topografias, diferindo, tanto morfológica como funcionalmente^{8,16}. Para além da micróglia, no parênquima do SNC estão presentes, ainda, outros fagócitos mononucleares, como sejam os macrófagos dos plexos coroideus, os meningoteliais e os perivasculares, cada um deles com os seus marcadores e presumíveis funções⁹⁰ (Figura 5).

Um dos desafios na identificação da micróglia é a ausência de um marcador fidedigno, específico para a detectar, independentemente do seu estadio de activação⁷. Por exemplo, as lectinas são usadas para a marcação da micróglia³⁷, mas marcam de igual forma as células endoteliais⁶⁸. Outros marcadores incluem o receptor de quimiocinas tipo 2, o CD34 (*Cluster of Differentiation 34*), um transportador de glucose (GLUT5) e a nestina³⁷.

Porém, os marcadores mais usados na identificação da micróglia são o CD45, o CD11b, o CD68, o *Major Histocompatibility Complex – class II* (MHC II) e o *Ionized calcium-Binding Adaptor molecule-1* (IBA-1)⁷.

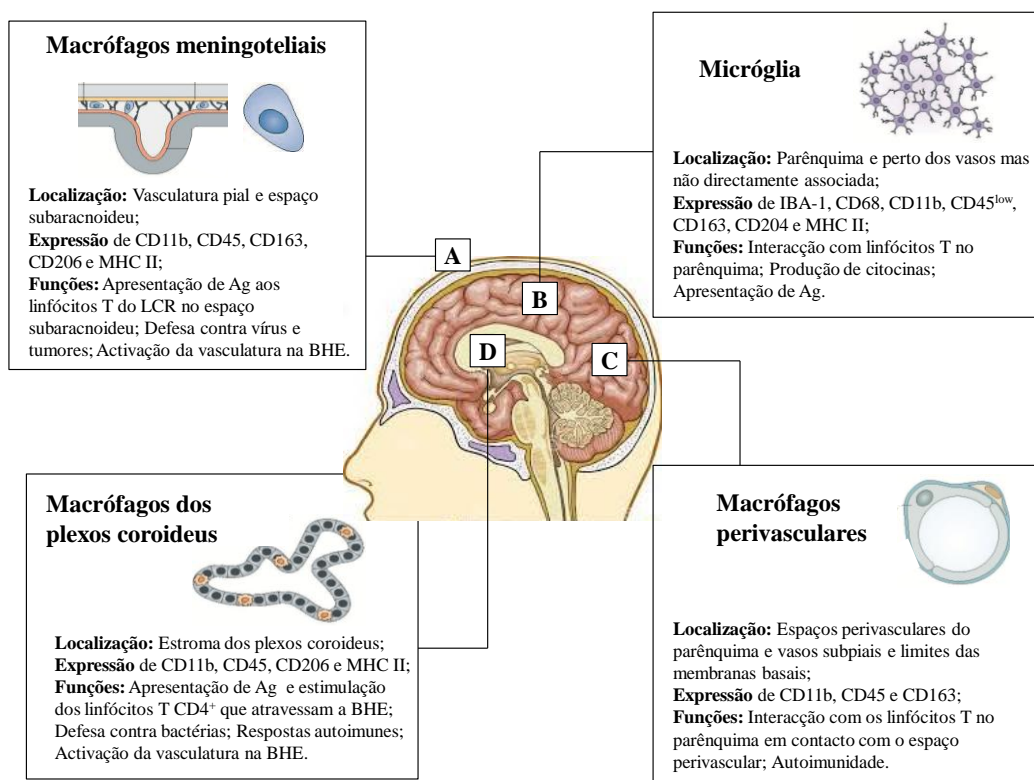


Figura 5. Vários tipos de macrófagos do SNC e a microglia. Macrófagos (A, C e D) e microglia (B) em diferentes regiões do SNC com algumas diferenças morfológicas e de identificação. Adaptado de David, S. (2011) ⁴².

* **Ag** – Antígeno/s; **BHE** – Barreira Hematoencefálica; **CD** – Cluster of Differentiation; **IBA-1** - Ionized calcium-Binding Adaptor molecule-1; **LCR** – Líquido Cefalorraquidiano; **MHC II** - Major Histocompatibility Complex - class II.

A marcação com o anticorpo (Ac) anti-CD45 tem sido usada para a identificação de toda a população microglial. Porém, sendo o CD45 um antígeno (Ag) comum a todos os leucócitos, tanto permite detectar estas células, presentes no encéfalo, como, por exemplo os linfócitos⁷. A microglia expressa ainda níveis de CD45 muito inferiores aos dos macrófagos perivascularres, particularmente em condições de equilíbrio estável (*steady-state*)³⁹.

O CD11b é um membro da família das integrinas e é expresso na membrana de vários leucócitos (monócitos, células *natural killers* (NK), granulócitos e macrófagos), de células da medula óssea e de algumas células sanguíneas. Funcionalmente, regula a adesão e migração dos leucócitos para a mediação das respostas inflamatórias⁷⁵.

O marcador CD68 é uma glicoproteína transmembranar lisossomal/endossomal de 110kDa que está expressa nas células da linha hematopoiética mielóide, incluindo células da micróglia^{7,45} e macrófagos^{7,68}.

No estado não activado, a micróglia, particularmente na SB, expressa baixos níveis de um subtipo do complexo do *Human Leukocyte Antigen* (HLA), o HLA-DR (MHC II) no encéfalo humano saudável, facto associado à capacidade de apresentação de Ag⁸¹. O MHC II é uma molécula do complexo *major* de histocompatibilidade classe II e é expresso em células apresentadoras de Ag (*Antigen Presenting Cells* - APC), ou seja, apenas em células com funções imunitárias, como os macrófagos e a micróglia, as células dendríticas e os linfócitos B¹. Nesse sentido, o MHC II está normalmente expresso em células da micróglia activada^{7,36}.

A molécula de ligação ao cálcio IBA-1, descoberta em 1996, é uma proteína de 17kDa consistindo em 147 aminoácidos e codificante para o *Allograft Inflammatory Factor-1* (AIF-1), presente na região do complexo MHC III²⁰. A expressão de IBA-1 parece ser específica para a micróglia *in vitro* e *in vivo*, constitutiva e independente do seu estadio de activação, e terá um papel importante na regulação da função da micróglia (especialmente quando activada)⁵².

O IBA-1 tem sido usado para diferenciar a micróglia dos macrófagos, em tumores e noutras patologias, quando usado com outros marcadores^{8,19}. De facto, um trabalho de Deininger *et al* (2000)¹⁹ em gliomas de ratinhos, com marcação dupla com ED2 (marcador para macrófagos maduros de ratinhos) e AIF-1 (marcador da micróglia), mostrou não haver qualquer co-deteção. Por outro lado, o marcador CD163 foi sugerido como o equivalente ao ED2 em humanos, e num estudo de Borda *et al* (2006)⁸, foram identificados macrófagos dos plexos coróides, meningoteliais e perivasculares através desta marcação, distinguindo-os da

micróglia (AIF-1). Na verdade, apesar de o IBA-1 ser geralmente admitido como uma molécula específica da micróglia³⁷, são necessários mais estudos para o confirmar⁷, uma vez que há evidência de que o IBA-1 também possa estar presente noutras células da linha monocitária, para além da micróglia⁵².

Como foi referido anteriormente, em situações patológicas, estarão presentes dois tipos de células, a micróglia e os macrófagos¹⁶. A separação e a identificação da primeira relativamente aos segundos são feitas, apesar de difícil, com base na sua morfologia e localização em relação a outras estruturas⁸ (ver Figura 5).

Do ponto de vista histológico, a identificação e separação da micróglia e dos macrófagos torna-se difícil, também porque a maioria dos marcadores utilizados são simultaneamente expressos nos dois tipos de células⁷.

Na literatura, dada a impossibilidade de distinguir com grande grau de certeza estes dois elementos celulares nos estudos histológicos, surge commumente a designação de população micróglia/macrófagos (MG/MC). Este termo é referido na maioria dos casos, chegando alguns autores a utilizá-lo ao mesmo tempo que designam micróglia^{36,109}. Neste trabalho, irá ser utilizado o termo “micróglia” para denominar os elementos celulares imunitários presentes no SNC, mas que poderão, como acabou de ser referido, corresponder também a macrófagos.

A separação destes dois elementos tem sido realizada através de técnicas de citometria de fluxo a duas cores, com marcação simultânea do CD45 e do CD11b. As duas populações distinguir-se-ão, então, da seguinte forma: CD45⁻/CD11b⁺ (micróglia) e CD45^{high}/CD11b⁺ (macrófagos)⁸². A micróglia pode ainda ser diferenciada dos macrófagos perivasculares

através do fenótipo $CD45^-/CD11b^+/CD14^-$ (micróglia), em contraste com o $CD45^+/CD11b^+/CD14^+$ (macrófagos perivasculares) ⁸.

No entanto, estes estudos por citometria de fluxo não permitem ter uma noção exacta da acção imunitária que se desenvolve *in situ* e, nomeadamente, visualizar morfologicamente a interacção destes dois elementos celulares com as diferentes estruturas tecidulares.

2.3. Papel no SNC normal

No SNC adulto e saudável, as células da micróglia apresentam-se na forma ramificada com um corpo celular de pequenas dimensões, redondo e com prolongamentos finos, a já referida micróglia residente¹⁰⁰. Apesar deste estado residente, a micróglia é mais do que uma população celular “adormecida”, revelando-se dinâmica ao estabelecer contactos contínuos com outras células por intermédio dos seus prolongamentos^{29,56}.

Há evidência de que a micróglia ramificada desempenha importantes funções durante o desenvolvimento encefálico e espinhal^{43,100}. A partir de estudos *in vivo*, sabe-se que a micróglia pode regular a neurogénese no hipocampo e na zona subventricular, pelo menos após um acidente vascular isquémico. Por outro lado, liberta factores neurotróficos essenciais para a neurogénese, quando em cultura com células estaminais neuronais⁸⁷. As suas funções fagocitárias têm sido sugeridas como importantes elementos na neurogénese, ao permitir remover os neuroblastos mortos durante a mesma⁹⁵.

É possível que, durante o desenvolvimento encefálico, a micróglia “suporte” a sinaptogénese através da síntese de factores neurotróficos e da regulação e remodelação da transmissão sináptica⁸⁸. Além disto, “permitirá”, ainda, a sobrevivência dos neurónios pela libertação de diversos factores, como sejam o *Nerve Growth Factor* (NGF), o *Glial cell line-*

Derived Neurotrophic Factor, o *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), o *Brain-Derived Neurotrophic Factor*, o *Ciliary Neurotrophic Factor*, a *Neurotrophin-3* e a *Insulin-like Growth Factor-1*⁹⁵. Por fim, parece, também, potenciar a remielinização, a oligodendrogénese e a angiogénese⁸¹.

Sabe-se ainda que a micróglia pode controlar directamente a morte neuronal. No cerebelo, induz a morte das células de Purkinje pela libertação de *Reactive Oxygen Species* (ROS) ⁵. De igual modo, na retina e na medula espinhal, induz a apoptose neuronal via produção do NGF e do *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), respectivamente^{5,43}.

Por outro lado, é conhecido também que a actividade neuronal e o seu “microambiente” controlam o estadio quiescente da micróglia, e a sua própria actividade é alvo da “supervisão” neuronal. Os neurónios suprimem a activação da micróglia por intermédio de contactos célula-a-célula, por libertação de moléculas como, por exemplo, o ligando da quimiocina CX₃C (CX₃CL1) e, ainda, por proteínas regulatórias expressas na sua superfície (CD47, CD200, CD22) ⁹⁵. A sinalização induzida pelos receptores CD172, CD200R, CD45 e CX₃CR1, expressos nas células da micróglia, após interacção com os ligandos neuronais CD47, CD200, CD22 e CX₃CL1, respectivamente, promove a inibição da activação da micróglia, mantendo-a no seu estado residente⁹⁵ (Figura 6).

Esta regulação microglial por parte das células neuronais tem importância na compreensão das alterações morfológicas que podem ocorrer em várias doenças do SNC⁸⁶. Por exemplo, em modelos da DP e da ELA, a deleção de CX₃CR1 promove a hiperactividade das células da micróglia e aumenta significativamente a perda neuronal. Por outro lado, na DA, a ausência de CX₃CR1 na micróglia reduz a morte neuronal, enfatizando a complexidade dos diferentes estadios de inflamação e das diferentes doenças⁹⁵.

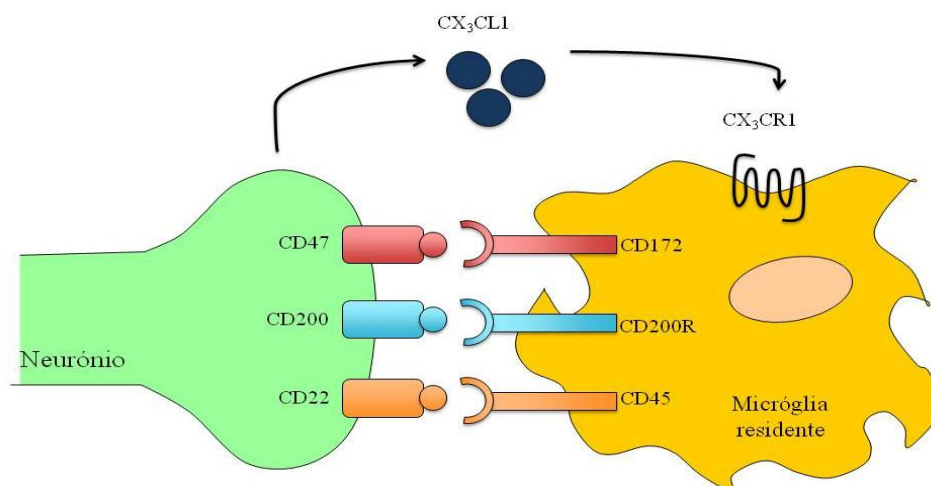


Figura 6. Micróglia no *steady-state* com morfologia ramificada e fenótipo residente. Este fenótipo é mantido, em parte, através de interações que a micróglia estabelece com os neurónios, incluindo CX₃CL1, CD47, CD200 e CD22, os quais actuam nos receptores correspondentes expressos na micróglia: CX₃CR1, CD172, CD200R e CD45, respectivamente. Transcrito de Saijo, K. *et al* (2011)⁹⁵. * **CD** – *Cluster of Differentiation*; **CX₃CL1** – Ligando da quimiocina CX₃C; **CX₃CR1** – Receptor 1 da quimiocina CX₃C.

2.4. Papel em diferentes patologias

A micróglia tem sido encarada como uma população de células com diversos fenótipos, alguns benéficos, outros prejudiciais⁷. O seu principal papel é actuar como primeira linha de defesa contra qualquer insulto no SNC. Neste caso, é activada, assumindo a forma amebóide e a capacidade de se dirigir activamente para o local da lesão, facto que envolve alterações génicas e morfológicas^{29,81}. Tal como os macrófagos, a micróglia pode exibir dois fenótipos activos diferentes: M1 (activação clássica) e M2 (activação alternativa)⁹⁵.

Em geral, a activação clássica está associada a situações patológicas causadas, pelo menos parcialmente, por alguma forma moderada de inflamação, como é o caso da diabetes tipo 2 e da arteriosclerose. Em condições patológicas, como sejam os tumores gliais, pensa-se que a micróglia adquira um fenótipo M2, como resultado de uma activação alternativa⁹⁷ (desenvolvido no Capítulo 4).

Sendo um “sensor cerebral”, a micróglia expressa normalmente *Toll-Like Receptors* (TLR) de identificação de patógenos (*Pathogen Recognition Receptors* – PRR), que reconhecem os seus ligandos, *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP). Após uma patologia infecciosa ou de outro tipo, ocorre a ligação dos PAMP aos PRR expressos na micróglia. Esta interacção induz a micróglia a produzir péptidos antimicrobianos, citocinas, ROS e óxido nítrico (*Nitric Oxide* – NO), todos envolvidos na imunidade inata e característicos do fenótipo M1 da micróglia. Nesta activação, a micróglia expressa ainda moléculas MHC II necessárias à apresentação de Ag aos linfócitos T e produz IL importantes para a diferenciação e activação dos linfócitos T *naïve* em linfócitos T auxiliares, resultando na imunidade adaptativa^{90,95} (Figura 7).

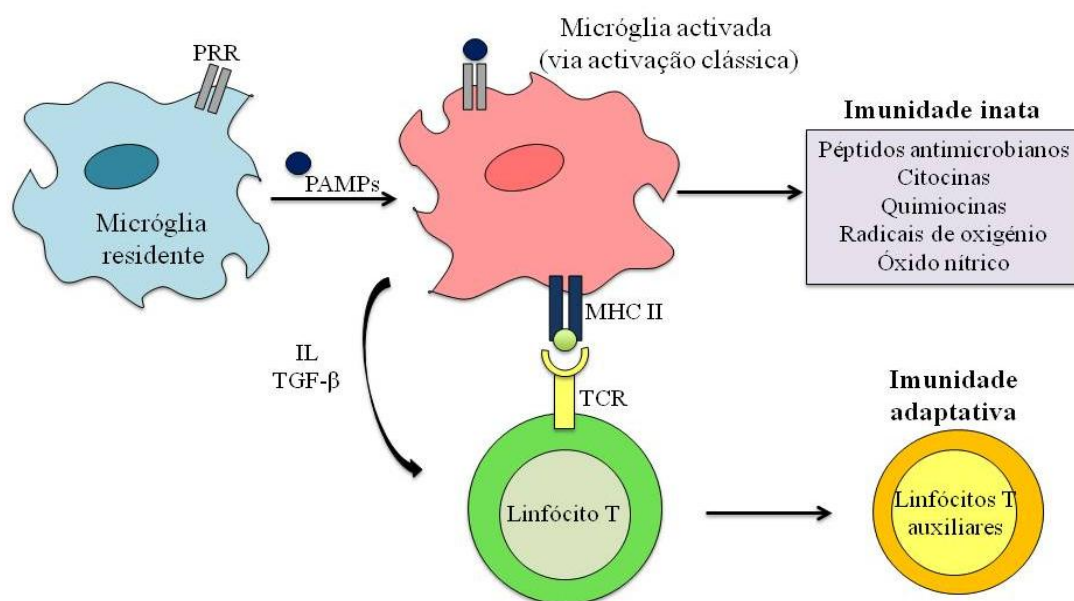


Figura 7. Activação clássica da micróglia (M1). Através das alterações fenotípicas que sofre, a micróglia participa nas respostas imunitárias inata e adaptativa. Adaptado de Saijo, K. *et al* (2011)⁹⁵. * **MHC II** - *Major Histocompatibility Complex - class II*; **PAMP** - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*; **PRR** - *Pathogen Recognition Receptors*; **TCR** - *T-Cell Receptor*; **TGF-β** - *Transforming Growth Factor-β*.

Em condições patológicas, a activação clássica da micróglia tem sido associada à DP, à DA, à esclerose múltipla (EM) e a perturbações neuropsiquiátricas associadas ao vírus da

imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus* – HIV) (*HIV-Associated Neuropsychiatric Disorders* – HAND)^{95,104}. Em pacientes com DP e em modelos animais da doença, têm sido observados sinais de inflamação, como seja a activação da micróglia e o aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios no LCR^{95,104}.

Na DA, os agregados oligoméricos do péptido β -amilóide (β A) têm a capacidade de activar a micróglia através de vários receptores, como os TLR, induzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios conhecidos por serem neurotóxicos⁹⁵. A micróglia apresenta ainda um papel neuroprotector por intermédio da libertação de proteolases, que degradam o β A, e da expressão de receptores, envolvidos na fagocitose do mesmo⁷².

A micróglia é conhecida como um elemento importante no aparecimento da encefalomielite autoimune experimental, modelo para a EM, através da apresentação de Ag aos linfócitos T *naive*, bem como pela produção de citocinas necessárias à diferenciação e activação dos linfócitos T⁸⁹.

A infecção pelo HIV causa uma imunodeficiência sistémica e pode causar demência ou doenças neuropsiquiátricas, globalmente designadas HAND. As células HIV⁺ atravessam a BHE e infectam células residentes do parênquima encefálico, tais como a micróglia e outras células da linha mielóide, resultando na activação das suas respostas imunitárias inatas⁹⁵. No entanto, a resposta pró-inflamatória persistente da micróglia poderá contribuir para o agravamento e avanço da patologia pela produção de ROS e de citocinas pró-inflamatórias⁷².

Em resumo, embora a M1 da micróglia produza respostas inatas e adaptativas a situações de infecção ou outras lesões, pode também desencadear respostas inflamatórias que poderão contribuir para a progressão da doença, através da produção de factores neurotóxicos, como acontece em algumas das patologias referidas⁹⁵.

3. Tumores gliais

3.1. Tumores do Sistema Nervoso

A classificação dos tumores do SN tem sofrido várias alterações ao longo do último século, desde a primeira realizada por Bailey e Cushing, em 1926^{64,84}. A Organização Mundial de Saúde (OMS) desempenha um importante papel neste sentido, tendo sido já publicadas quatro versões da Classificação de Tumores do SN. Nela foram incluídos parâmetros de classificação como a localização anatómica da lesão, o tipo histológico e o grau de malignidade do tumor, essenciais para propósitos prognósticos e terapêuticos⁹⁷.

A actual classificação da OMS, de 2007, para os tumores do SN foi elaborada com base na sua origem celular e dividida em 6 categorias⁶⁴:

1. Tumores neuroepiteliais, englobando os tumores gliais (ou gliomas), os tumores dos plexos coróides e os tumores embrionários, como os meduloblastomas.
2. Tumores dos nervos cranianos e paraespinhais, incluindo os schwannomas.
3. Tumores das meninges, que englobam os tumores das células meningoteliais, os provenientes do mesênquima e outros relacionados com as meninges, como os hemangioblastomas.
4. Tumores da linha hematopoiética e linfomas.
5. Tumores das células germinativas, incluindo os germinomas.
6. Tumores metastáticos.

3.2. Classificação dos tumores gliais

Historicamente, os tumores neuroepiteliais têm sido classificados de acordo com a sua morfologia histológica e semelhança com os elementos celulares diferenciados do SN. Os tumores gliais têm como origem as células da glia: os astrocitomas exibem um perfil semelhante aos astrócitos maduros ou aos seus percursores; os oligodendrogliomas assemelham-se aos oligodendrócitos; os ependimomas às células ependimárias⁶⁴.

Os tumores gliais são, também, classificados com base no seu comportamento biológico reflectido nos diferentes graus de anaplasia, que variam do grau I (os menos agressivos biologicamente) ao grau IV (os mais agressivos). Os tumores de grau I e II são considerados gliomas de baixo grau, e os tumores de grau III e IV são gliomas de alto grau. Esta classificação é baseada em critérios histológicos, como a atipia nuclear, o índice mitótico, as alterações da microvascularização tumoral, a presença de necrose e a capacidade invasiva. Como tal, os astrocitomas são classificados do grau I ao grau IV, os oligodendrogliomas do grau II ao grau III e os ependimomas do grau I ao grau III de anaplasia^{26,64}.

Geralmente, os tumores gliais de grau I têm um polimorfismo e hipercromasia nucleares discretos e células bem diferenciadas. São considerados benignos e curáveis após remoção cirúrgica, se total. Os de grau II são considerados mais malignos e, para além das alterações de grau I, apresentam baixo índice mitótico, muitas vezes recidivam e podem progredir para gliomas de alto grau de anaplasia. Aos de grau III acrescenta-se um índice mitótico elevado. Finalmente, os de grau IV evidenciam também alterações da respectiva microvascularização e necrose, geralmente “geográfica” e estão associados, em regra, a uma rápida evolução, quase sempre fatal^{14,84}.

Uma das características principais dos tumores gliais é a sua capacidade de invasão. Sabe-se que a grande maioria, tanto de baixo como de alto grau, é infiltrativa, invadindo o parênquima envolvente, a maior ou menor distâncias. Este fenómeno inicia-se a partir do núcleo tumoral migrando as células tumorais para o parênquima circundante, a denominada “zona de invasão”^{14,64}. A Figura 8 mostra as três zonas de um caso de glioblastoma multiforme (astrocitomas grau IV, a partir daqui designados de GBM) com coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E).

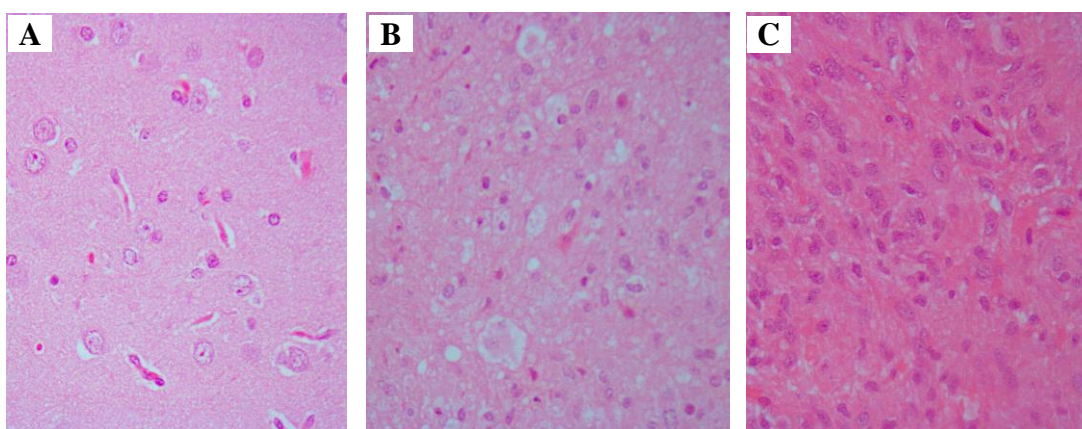


Figura 8. Cortes histológicos de H&E de um GBM. Zona de tecido histologicamente normal (A), uma zona de invasão do parênquima (B) e o núcleo tumoral (C). Fotografias do Laboratório de Neuropatologia do Hospital de Santa Maria. Ampliação de 400x. * **GBM** – Glioblastoma Multiforme; **H&E** – Coloração de Hematoxilina & Eosina.

Parece haver uma alteração nos componentes da matriz extracelular, que acaba por modular as características de migração e invasão das células tumorais. As células dos gliomas conseguem migrar mais de 4-7cm de distância do núcleo tumoral e fazem-no para distintas estruturas anatómicas, com preferência para a membrana basal dos vasos sanguíneos, espaço subependimário e feixes nervosos da SB. Uma das primeiras etapas para a invasão do parênquima normal é a adesão das células tumorais à matriz, seguida de uma proteólise da mesma através da secreção de metaloproteases (*Matrix Metalloproteinases* - MMP) pelas células dos gliomas e/ou endoteliais. Subsequentemente, os prolongamentos celulares

estendem-se para o espaço criado e, finalmente, as células ocupam inteiramente o local, reconstruindo o citoesqueleto e expressando novos receptores de adesão (maioritariamente, integrinas)⁹⁴.

3.3. Epidemiologia dos tumores gliais

Anualmente são diagnosticados, aproximadamente, 3.7 novos casos de homens e 2.6 de mulheres com um dos tipos de tumor do SNC, em cada 100.000 pessoas. Em Portugal, surge quase o dobro dos casos por ano (6.7 homens e 5 mulheres em 100.000 pessoas)⁴¹. De facto, estas incidências são mais elevadas nos países mais desenvolvidos e a população caucasiana surge como a mais afectada deste tipo de tumor, quando comparada com a africana ou com a asiática^{77,79}. No entanto, admite-se como muito provável que nestes continentes estes tumores estejam subdiagnosticados⁷⁷.

Os tumores gliais são os mais comuns do SNC, representando cerca de 28 a 32% do seu total, e 80% destes são malignos^{79,80}, com uma incidência anual estimada entre os 5 a 10 casos por 100.000 pessoas, maioritariamente pessoas adultas^{24,64}.

A sua incidência varia com a idade e com o género. Assim, por exemplo, os astrocitomas pilocíticos são mais comuns na infância e adolescência, enquanto os GBM surgem principalmente nos adultos. Os astrocitomas pilocíticos apresentam, ainda, uma discreta predominância feminina⁸⁰ enquanto os astrocitomas de grau II e III, e os oligodendrogliomas apresentam maior incidência masculina^{24,26}.

Estes tumores estão entre os mais fatais, ocupando a terceira posição das causas de morte por cancro e a segunda por doença neurológica, logo atrás dos acidentes vasculares cerebrais²⁴.

Apesar da grande heterogeneidade dos doentes, as características do glioma são importantes para o seu prognóstico. Em doentes com um glioma de grau II, a esperança média de vida é de cerca de 6 anos e nos de grau III é de cerca de 2 a 3 anos, após o seu diagnóstico. A maioria dos doentes com lesões de grau IV, principalmente os mais idosos, morre 1 ano após o diagnóstico^{64,84}. No entanto, outros critérios, como a localização, as características radiológicas, a extensão da remoção cirúrgica e as alterações genéticas têm relevância para o prognóstico^{14,64} (Tabela 2).

Tabela 2. Principais características de três tipos de tumores gliais (astrocitoma, oligodendroglioma e ependimoma).

Tipo de tumor glial ⁶⁴	Grau ⁶⁴	Nomenclatura ⁶⁴	Faixa Etária ⁶⁴	Localização ⁶⁴	Incidência (% de todos os tumores cerebrais) ⁶⁴	Incidência (% de todos os gliomas) ⁸⁰	Sobre-vida após 5 anos (%) ⁷⁹
Astrocitoma	I	Astrocitoma pilocítico	< 20	Cerebelo, quiasma óptico, medula espinhal	5-6%	5.1%	94.05%
	II	Astrocitoma difuso	30-40	Hemisférios cerebrais	10-15%	9.1%	47.58%
	III	Astrocitoma anaplásico	45-50	Hemisférios cerebrais	10-15%	6%	27%
	IV	GBM	45-75	Hemisférios cerebrais	12-15%	54.4%	4.7%
Oligodendroglioma	II	Oligodendroglioma de baixo grau	40-45	Hemisférios cerebrais	2.5%	6.1%	79.25%
	III	Oligodendroglioma anaplásico	45-50	Hemisférios cerebrais	1.2%	< 7.3%	48.22%
Ependimoma	II	Ependimoma de baixo grau	< 16; 30-40	IV ventrículo, cerebelo	4.7%	6.8%	66% ⁷⁷
	III	Ependimoma anaplásico	> 16	IV ventrículo	1%		

* **GBM** – Glioblastoma multiforme.

3.4. Astrocitomas

Os astrocitomas compõem 64% dos tumores intracranianos⁷⁷ e podem ser divididos, por ordem crescente de anaplasia, em pilocíticos (grau I), difusos (grau II), anaplásicos (grau III) e GBM (grau IV)⁶⁴. Esta separação tem como base as características de anaplasia atrás referidas.

Os astrocitomas pilocíticos (grau I) correspondem a 5.1% de todos os tumores gliais^{64,80}, com uma taxa de incidência nos Estados Unidos da América (EUA) de 0.33 novos casos em 100.000 pessoas por ano⁷⁹. Os seus locais preferenciais são o cerebelo, quiasma óptico e a medula espinhal. Histologicamente, caracterizam-se por um padrão bifásico, fibrilhar e microquístico, células longas, núcleos ovais e uniformes, com prolongamentos fibrilares finos, dando a impressão de cabelo (latim *pilo* – cabelo). A presença de corpos eosinófilos e granulares, e de fibras de Rosenthal é característica deste tipo de tumor. Os que se localizam no cerebelo são normalmente removidos na sua totalidade, daí o seu bom prognóstico^{84,98}, com cerca de 94% dos doentes vivos 5 anos após a cirurgia⁷⁹.

Os astrocitomas difusos (grau II) compreendem cerca de 10 a 15% de todos os tumores cerebrais⁶⁴, com uma incidência anual de 0.11 novos casos por 100.000 pessoas, nos EUA⁷⁹. Afectam sobretudo os adultos e podem surgir em qualquer local do SNC, mais frequentemente nos lobos frontais e temporais⁶⁴. Histologicamente, são divididos em três subtipos: fibrilhar (o mais comum), com frequente progressão para graus de anaplasia mais elevados; protoplásmico (origem na SC e características citológicas semelhantes a astrócitos protoplásmicos); gemistocítico (“cevados” ou “gordos”), com citoplasma abundante^{84,98}.

Os astrocitomas anaplásicos (grau III) ocupam 10 a 15% de todas as neoplasias intracranianas⁶⁴ e cerca de 6% de todos os gliomas⁸⁰, com um pico de incidência aos 50 anos,

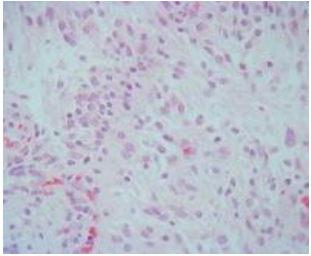
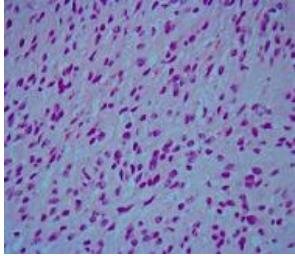
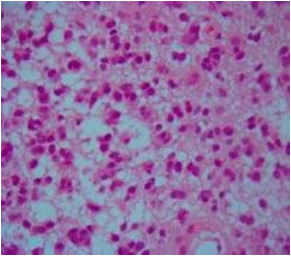
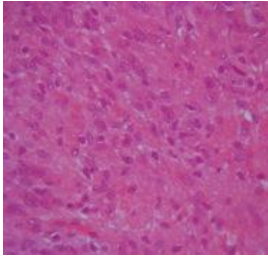
ligeira predominância masculina e predilecção pelos hemisférios cerebrais. Para além do polimorfismo dos seus elementos e respectivos núcleos, o índice mitótico é elevado mas a proliferação da microvascularização e a necrose não estão presentes⁶⁴. Cerca de 27% dos indivíduos com este tipo de tumor glial estão vivos ao fim de 5 anos após o diagnóstico⁷⁹, mas apresentam uma elevada taxa de progressão para GBM^{84,98}.

Os GBM são os tumores do SN mais frequentes, logo a seguir aos meningiomas⁸⁰, ocupando aproximadamente 12 a 15% de todas as neoplasias intracranianas⁶⁴, 54% dos tumores gliais⁸⁰ e 60 a 75% de todos os tumores da série astrocitária⁶⁴. Localizam-se predominantemente nas estruturas subcorticais e, devido à sua elevada capacidade infiltrativa, são raramente removidos na totalidade. Assim, a sobrevida média é geralmente inferior a 1 ano⁶³, dependente, entre outros factores, da idade (melhor prognóstico para os doentes com menos de 40 anos). Podem ser primários (*de novo*) ou secundários aos astrocitomas de menor grau^{84,98}. As principais características dos astrocitomas encontram-se descritas na Tabela 3.

3.5. Oligodendrogliomas

Os oligodendrogliomas são classificados em baixo grau (grau II) e anaplásicos (grau III). Microscopicamente, mostram várias características morfológicas que tornam, em geral, fácil o seu diagnóstico: limites celulares distintos, núcleos redondos, regulares e hipercromáticos rodeados de um halo claro artefactual (imagem em “ovo estrelado”), padrão vascular em “pés de galinha”, calcificações e frequente aglomeração sub-pial^{64,98}.

Tabela 3. Principais características histológicas dos astrocitomas ^{64,84}.

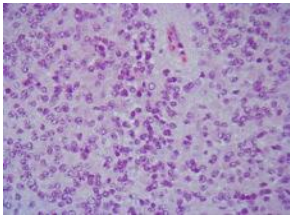
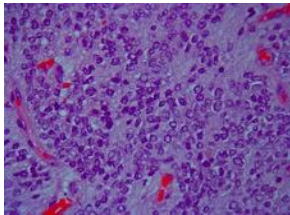
ASTROCITOMAS			
Astrocitomas pilocíticos (grau I)	Astrocitomas difusos (grau II)	Astrocitomas anaplásicos (grau III)	GBM (grau IV)
Padrão bifásico; Células longas, núcleos ovais e uniformes com prolongamentos finos; Presença de corpos eosinófilos e granulares, e de fibras de Rosenthal.	Baixa celularidade; Núcleos pequenos com discretas atipias; Astrócitos fibrilares.	Características de grau II; Índice mitótico elevado.	Padrão multiforme; Proliferação endotelial da microvascularização; Presença de necrose.
			

+ As imagens são referentes a amostras arquivadas no Laboratório de Neuropatologia. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Ampliação de 400X. *GBM – Glioblastoma Multiforme.

Os oligodendrogliomas de baixo grau correspondem a cerca de 2.5% de todos os tumores cerebrais primários⁶⁴, 6.1% de todos os tumores gliais⁸⁰ e, nos EUA, surgem 0.28 novos casos em 100.000 pessoas por ano⁷⁹. Apresentam uma ligeira predominância para o género masculino e localização nos hemisférios cerebrais, mais frequentemente nos lobos frontais⁶⁴.

Os oligodendrogliomas anaplásicos representam 1.2% de todos os tumores cerebrais primários⁶⁴ e 5% dos malignos⁸⁰ e, aproximadamente, 20 a 35% dos tumores oligodendrogliais⁶⁴, com igual predominância do género masculino e localização frontal^{64,84}. As suas características histológicas mais frequentes são a elevada actividade mitótica, a atipia nuclear, a proliferação vascular acentuada e presença de necrose⁶⁴. As principais características dos oligodendrogliomas encontram-se sintetizadas na Tabela 4.

Tabela 4. Principais características histológicas dos oligodendrogliomas (grau II e III) ^{64,84}.

OLIGODENDROGLIOMAS	
Baixo grau (grau II)	Alto grau (grau III)
Celularidade e atipia nuclear moderadas.	Elevada celularidade; Atipia nuclear marcada; Proliferação endotelial da microvascularização; Necrose; Elevada actividade mitótica.
	

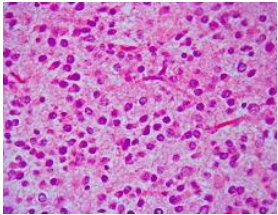
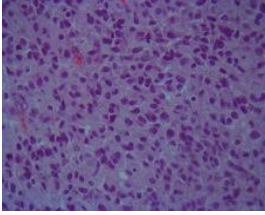
+ As imagens são referentes a amostras arquivadas no Laboratório de Neuropatologia. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Ampliação de 400X.

3.6. Ependimomas

Os ependimomas são classificados em subependimomas e ependimomas mixopapilares (grau I), baixo grau (grau II) e anaplásicos (grau III). Representam 1 a 5% dos tumores intracranianos⁶⁴, 6.8% dos gliomas⁸⁰ e 60 a 70% estão localizados no IV ventrículo⁶⁴. Do ponto de vista histomorfológico, são caracterizados típica e mais frequentemente pela formação de pseudorosetas perivascularares. O seu prognóstico é variável, mas as crianças têm pior prognóstico do que os adultos face, especialmente, à radioterapia ser ineficaz nesta faixa etária^{26,64,84}.

Os ependimomas de grau II representam 2 a 9% dos tumores neuroepiteliais⁶⁴ e são as neoplasias neuroepiteliais intramedulares mais comuns^{26,64}. Os ependimomas anaplásicos (grau III) são mais frequentes nas crianças e localizam-se maioritariamente na fossa posterior, na região do IV ventrículo. Têm um prognóstico bastante desfavorável^{26,64}. As principais características dos ependimomas encontram-se sintetizadas na Tabela 5.

Tabela 5. Principais características histológicas dos ependimomas (grau II e III) ^{64,84}.

EPENDIMOMAS	
Baixo grau (grau II)	Alto grau (grau III)
Muito bem delineado; Celularidade moderada; Morfologia nuclear monomórfica; Presença de pseudorosetas perivascularares e de rosetas ependimárias.	Elevada actividade mitótica; Necrose; Elevada proliferação microvascular.
	

4. Acção da micróglia nos tumores gliais

O tecido tumoral obtido nas remoções cirúrgicas é composto, não apenas pelas células tumorais, como também por uma percentagem maior ou menor de células “não tumorais” (Figura 9). Sabe-se pouco sobre o papel destas neste “microambiente”¹⁰⁹. Apesar de o SNC ser considerado um sistema sem circulação linfática e estar protegido pela BHE, é invadido por linfócitos T e por APC, perante inúmeras patologias, incluindo os tumores gliais¹⁰⁷. Assim, para além das células tumorais, o referido “microambiente” contém também células endoteliais, astrócitos normais e reactivos, linfócitos T, macrófagos e micróglia^{13,63}.

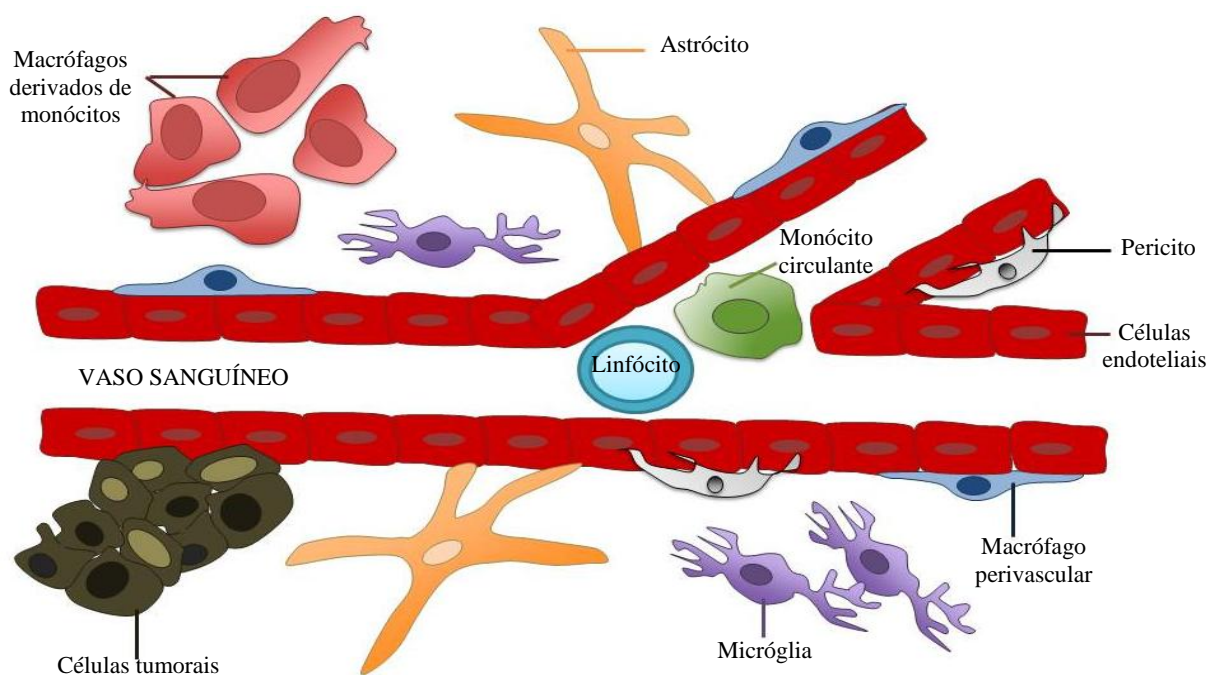


Figura 9. Esquema representativo de algumas das células constituintes do “microambiente tumoral”. Adaptado de Lorger, M. (2012)⁶³.

Foi em 1925 que Wilder Penfield¹⁰⁷ realizou a primeira descrição detalhada da micróglia em tecido de tumores gliais, referindo-se às mesmas como células fagocitárias, com morfologia amebóide semelhante à encontrada noutras patologias¹³.

A população associada aos tumores do SNC parece estar em proliferação, o que pode torná-la num importante elemento do “microambiente tumoral”^{13,63}. Badie *et al.* (2001), através de um estudo de citometria de fluxo de modelos experimentais de gliomas, demonstraram que a micróglia ocupava 13 a 34% do “microambiente tumoral” celular³, enquanto os macrófagos ocupavam cerca de 5 a 12% do mesmo³. No entanto, em oposição ao descrito, num estudo de Morris *et al* (1991), baseado na morfologia celular, foi observada uma maior infiltração macrofágica do que microglial em tecido de gliomas⁷¹.

Em geral, a micróglia e os macrófagos distribuem-se uniformemente em zonas normais, perivasculares e envoltantes dos gliomas de baixo grau. Em gliomas de alto grau (maioritariamente GBM) estão dispostos naquelas, mas acrescidas da zona tumoral⁷¹. Estes factos foram corroborados por Badie *et al*, que avaliaram a localização da micróglia em tecido tumoral e em tecido normal do hemisfério cerebral oposto, verificando que estas células se distribuíam difusamente por todo o tecido tumoral e nas zonas contralaterais, supostamente constituídas apenas por células não tumorais³.

Roggendorf *et al* (1996) observaram, em ependimomas de baixo grau, uma distribuição perivascular de micróglia e de macrófagos (separadamente), ao passo que em ependimomas de alto grau esta distribuição mostrou-se mais elevada e num padrão irregular⁹². Os mesmos autores constataram que a micróglia e os macrófagos se localizavam maioritariamente no centro e na periferia dos tumores gliais, em comparação com zonas histologicamente normais⁹². Mostraram ainda existir uma escassa infiltração de MG/MC em gliomas de baixo grau, contrastando com os de grau mais elevado⁹², facto que corroborou o trabalho de Morris *et al*⁷¹. No entanto, estes dois estudos valeram-se de uma amostra pouco representativa de cada um dos tipos de tumores gliais.

A contrastar com as conclusões anteriores, Klein *et al* (2001), utilizando o Ac anti-Ki67 (marcador de células em ciclo celular, ou seja, em proliferação), mostraram que os astrocitomas pilocíticos apresentavam níveis de micróglia em proliferação significativamente mais elevados do que em qualquer outro tipo de astrocitoma⁵⁸. Corroborando estes resultados, Geranmayeh *et al* (2007) demonstraram que, no caso dos astrocitomas gemistocíticos (grau II), a expressão da micróglia estava aumentada, atingindo cerca de 50% do componente celular nos tumores anaplásicos³⁰.

Apesar da expressão da micróglia parecer estar mais elevada nos tumores gliais, o seu papel preciso permanece pouco conhecido¹⁰⁷.

4.1. Papel potenciador do crescimento tumoral

Inicialmente, o facto de a micróglia ser observada no “microambiente tumoral” levou a que fosse assumida como um agente protector, actuando contra o crescimento dos tumores gliais¹⁰⁷. No entanto, evidências recentes contradizem esta afirmação, na medida em que a micróglia poderá contribuir para o ambiente imunossupressor do glioma e, assim, promover a proliferação e progressão tumorais⁶.

A micróglia é fonte de enzimas, como as MMP, que degradam a matriz extracelular e a sua libertação parece ajudar o crescimento tumoral¹⁰⁷. O mesmo se observa com o *Epidermal Growth Factor* (EGF) e o *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), ambos factores promotores de proliferação tumoral. A micróglia parece, portanto, ter um papel activo na progressão tumoral assegurando a migração (através das MMP), a proliferação (devido à produção de EGF) e a angiogénese (através da libertação de VEGF) das células do tumor glial⁶³.

De facto, Markovic *et al* (2005), num trabalho de cultura de células de ratinhos, atribuíram-lhe um papel preponderante na invasão tumoral das células de GBM⁶⁶. A deleção da micróglia, normalmente presente no “microambiente tumoral”, parecia diminuir a capacidade infiltrativa do tumor, facto confirmado pela recuperação dessa capacidade após a sua adição a culturas sem a mesma. Propuseram, então, que a micróglia potenciaria a actividade de MMP, também produzidas pelos gliomas e, deste modo, a invasão tumoral dos tumores intracranianos⁶⁶.

Num estudo de Dagainakatte *et al*, com animais experimentais deficientes para o gene da neurofibromatose 1, foi sugerida que a supressão da MG/MC pela minociclina resultava na diminuição da progressão de gliomas ópticos¹⁵. Em 2009, Markovic *et al* mostraram que a administração de ganciclovir em tumores gliais resultava em 70% de diminuição do contingente de MG/MC e em cerca de 80% de diminuição do volume tumoral, suportando a hipótese de que a MG/MC poderia promover o crescimento tumoral⁶⁷.

Sabe-se, também, que os tumores gliais inibem a actividade das células envolvidas nas funções imunitárias do organismo, de que a micróglia é um exemplo, por intermédio da produção de IL (IL-4, IL-6 e IL-10), de prostaglandinas E2 (PGE2) e de TGF- β , e pela diminuição das proteínas da matriz extracelular^{63,95}. A produção destes factores parece ser responsável pela activação alternativa M2 da micróglia (Figura 10).

Durante este estadio, as células tumorais comunicam com a micróglia, levando à alteração do seu fenótipo⁹⁵. A sua capacidade de apresentação de Ag diminuirá, bem como a sua função imunitária contra o tumor. Assim, esta será inibida de produzir citocinas necessárias à actividade dos linfócitos T citotóxicos CD8⁺ e dos T auxiliares CD4⁺ e, deste modo, estará envolvida na imunoresistência tumoral^{63,107}. Os tumores gliais comprometerão,

desta forma, a actividade da micróglia, impedindo-a de comunicar com os linfócitos T, ao suprimirem localmente as suas respostas específicas⁹⁵.

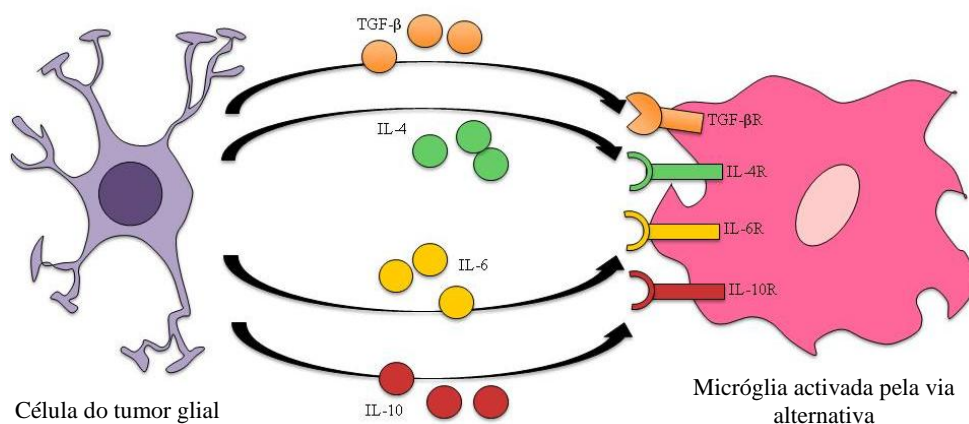


Figura 10. Ativação alternativa (M2) da micróglia por interacção das células do tumor glial, as quais secretam factores de crescimento e IL. Transcrito de Saijo, K. *et al* (2011)⁹⁵. * **IL** – Interleucina/s; **TGF-β** – *Transforming Growth Factor-β*.

Zhai *et al* verificaram que as células tumorais co-cultivadas com MG/MC apresentavam um crescimento maior do que quando isoladas. A interacção entre a MG/MC e as células dos gliomas em cultura parece igualmente activar a MG/MC, que deixará de desempenhar uma resposta fagocitária, promovendo a proliferação tumoral¹⁰⁹.

Além de ser atribuído um papel directo e um indirecto à micróglia de potenciação do crescimento tumoral^{15,67}, existe uma outra teoria recentemente avançada por alguns autores, na qual a própria micróglia será um elemento neoplásico constituinte da massa tumoral⁵⁰. Esta hipótese surgiu a partir da constatação de que vários tumores (pulmão, mama, colón e rim) contêm células neoplásicas com propriedades de macrófagos, e capacidade de invasão e metastização⁵⁰.

Como descrito no Capítulo 3 deste trabalho, face às suas características epidemiológicas e biológicas, os GBM são tumores bastante agressivos e com um prognóstico quase sempre fatal^{18,63}. As suas células conseguem invadir outras áreas cerebrais, muitas

vezes, bastante afastadas do núcleo tumoral⁴⁸. Pelo mau prognóstico associado aos GBM, muitos autores têm estudado este tipo de tumor, nomeadamente no que se refere à expressão da micróglia⁶³, sendo apontado, por alguns, como o tipo de glioma que maior percentagem de MG/MC apresenta^{59,74}.

Neste sentido, juntaram-se duas teorias, a primeira de que tumores metastáticos possuirão células da linha mielóide (macrófagos) responsáveis pela migração das células do tumor primário para outros locais⁵⁰, e a segunda de que os GBM possam apresentar um mecanismo semelhante, devido à sua capacidade invasiva e à presença de MG/MC^{48,74}. Assim, Huysentruyt *et al* questionaram-se acerca da capacidade altamente infiltrativa dos GBM poder ser atribuída a células mielóides, presentes no seu “microambiente tumoral” que se tornariam neoplásicas com a progressão tumoral^{48,50}.

De facto, células neoplásicas presentes em modelos animais de GBM expressam várias propriedades comuns aos macrófagos e à micróglia, como a morfologia, adesão celular, capacidade de fagocitose e expressão génica de CD11b, CD45, CD68 e IBA-1⁴⁶. Este estudo foi ao encontro do que se observou em vários tumores invasivos e metastáticos⁵⁰.

Recentes descobertas de Persson e Englund (2009), através da dupla marcação imunohistoquímica de CD68 e hTRET (para as células de GBM), sugeriram que a actividade fagocitária encontrada em GBM humanos deverá ser correspondente a células da micróglia ou macrófagos malignos⁸⁶. Baseando-se nas semelhanças que parecem existir entre as células tumorais e os macrófagos, Huysentruyt *et al* (2011) admitiram que algumas células neoplásicas presentes em GBM seriam macrófagos ou micróglia transformados⁴⁸. A partir destas constatações, os autores remeteram-se para a teoria de fusogenicidade, já proposta em 1911, entre células somáticas e leucócitos, e na década de 1970, entre células tumorais e

células mielóides, que lhes dava a capacidade de migrar e invadir outros órgãos⁵⁰. Esta fusão, com a subsequente fusão nuclear, poderia produzir novos fenótipos, sem a aquisição de novas mutações. Estes híbridos neoplásicos assemelhar-se-iam a macrófagos, na medida em que teriam a capacidade de entrar e sair dos vasos sanguíneos, migrando para órgãos distantes, ao mesmo tempo que mantinham a capacidade de proliferação ilimitada característica de células tumorais^{48,50}.

Apesar destas evidências, continua a admitir-se maioritariamente que as células da micróglia/macrófagos presentes no “microambiente tumoral” são elementos “normais” do parênquima envolvente do tumor e não elementos neoplásicos e, portanto, sem função tumoral directa. Porém, não se garante que estas células, presentes, por exemplo, em GBM, não compoñham com este o total de células tumorais⁴⁸.

4.2. Papel supressor do crescimento tumoral

Sendo a micróglia a população de macrófagos residente no SNC⁴⁴ e, como tal, responsável pelas funções imunitárias do SNC¹⁰⁷, seria de esperar que combatesse o crescimento tumoral.

O papel protector da MG/MC foi evidenciado por vários estudos experimentais. Um deles, realizado por Kanamori *et al* mostrou que, na ausência da MG/MC, o crescimento tumoral era muito aumentado⁵⁴, igual resultado encontrado em culturas celulares de ratinhos²⁸. Esta constatação foi diferente da encontrada em tumores da mama e do pulmão, nos quais o crescimento tumoral estaria directamente relacionado com a presença aumentada de macrófagos^{62,88}. Em oposição ao exposto anteriormente, a administração sistémica de ganciclovir resultou numa delecção de 45% da MG/MC, com o consequente aumento do

crescimento tumoral em 33%^{28,63}. Assim, embora não completamente assente, admite-se que o conjunto da MG/MC possa contribuir para a diminuição do crescimento tumoral, desenvolvendo uma imunidade anti-tumoral em determinadas condições²⁸.

Num trabalho experimental com culturas de células de astrocitomas⁵¹ constatou-se que a produção de NO e de catepsina B pelas células da micróglia poderia estar envolvida na indução da apoptose das células de tumores gliais. O NO, produzido pela micróglia, é assumido como uma citocina pró-inflamatória, tendo um papel importante na regulação do crescimento tumoral⁵¹.

Por outro lado, num trabalho realizado por Voisin *et al* (2010), foi possível observar-se actividade fagocitária inicial da micróglia aquando da sua interacção com células de GBM apesar de, passadas algumas horas, esta actividade ser suprimida¹⁰⁵.

Através destes estudos percebe-se que a micróglia poderá estar envolvida na supressão do crescimento dos tumores, tendo capacidade de fagocitar e induzir a apoptose das células tumorais. Assim, a presença da micróglia, reflectida pela sua actividade, nos tumores gliais, parece influenciar o comportamento destes.

4.3. Potencial terapêutico da micróglia

O mau prognóstico dos tumores do SNC deve-se, em grande parte, à sua elevada capacidade de infiltração do parênquima envolvente. Mesmo quando são realizadas remoções cirúrgicas extensas, a esperança média de vida dos doentes é relativamente baixa²². Nos últimos anos, vários ensaios clínicos terapêuticos dos gliomas, focados apenas em factores específicos como os receptores do EGF e do VEGF, mostraram-se ineficazes²⁷. Compreender

os mecanismos moleculares subjacentes à invasão tumoral poderá ser um importante passo para o desenvolvimento de terapias efectivas contra os tumores gliais²².

Um dos possíveis alvos para estas terapias são as MMP libertadas pela micróglia, sendo vários os genes candidatos a reguladores da invasão tumoral⁹³. Estas enzimas são importantes na invasão, migração e angiogénese dos astrocitomas e de outros tumores cerebrais⁵⁷. Assim, o seu controlo tem sido objecto de possíveis estratégias de impedimento da progressão e até de tratamento dos gliomas⁵³.

As MMP maioritariamente associadas à invasão dos tumores gliais são a MMP-2 e a MMP-9, dada a sua expressão estar correlacionada com a progressão e com o grau de malignidade dos mesmos^{9,57}. A inibição destas duas enzimas com derivados de sulfonamidas resultou no decréscimo da invasão tumoral. Alguns ensaios clínicos com temozolamida (usado no tratamento de gliomas) e com marimastato (inibidor de MMP de largo espectro) têm evidenciado a importância das MMP na progressão e invasão tumorais^{9,61}. A combinação de cada um dos inibidores derivados de sulfonamidas (em doses baixas) com o temozolamida mostrou, em ratinhos, inibição da invasão e da viabilidade das células tumorais²⁷.

A gliciteína (metabolito bacteriano da glicitina isoflavona) é capaz de inibir a expressão da MMP-3 e da MMP-9 ao nível do DNA, do *Messenger Ribonucleic Acid* (RNA mensageiro - mRNA) e da síntese proteica em células de astrocitomas humanos, suprimindo a invasão destas células no parênquima normal⁶⁰. A mangiferina, uma glucosilxantona isolada de *Anemarrhena asphodeloides*, inibe especificamente a expressão génica, transcripcional e protéica de MMP-9 em células de astrocitomas humanos⁵³. Assim, também estes resultados poderão ser úteis no desenvolvimento de novas terapias anti-glioma²⁷.

Apesar de ainda ser controverso o papel das células da micróglia neste “microambiente tumoral”, são inúmeros os trabalhos desenvolvidos para o tratamento dos gliomas utilizando-a como alvo principal. Primeiro, será importante conhecer a sua expressão e distribuição nos diferentes graus dos vários tumores gliais, já que, em muitos trabalhos, nem todos os tipos de tumores gliais são incluídos. De seguida, o estabelecimento de um padrão desta expressão é fulcral para uma abordagem terapêutica mais eficaz e específica.

Existem várias formas de estudar a expressão da micróglia em tumores gliais, as quais podem passar, por exemplo, pelo estudo histológico, por técnicas de citometria de fluxo e/ou culturas de células. A vantagem da aplicação do estudo histológico prende-se com o facto de, desta forma, ser possível não só distinguir as várias populações celulares como perceber a sua localização e distribuição em relação aos diversos constituintes do “microambiente tumoral” e à sua envolvente (zona de invasão e zona de parênquima normal).

Nesta investigação, para levar a cabo o objectivo de avaliar o comportamento de uma população celular específica (micróglia) *in situ*, recorreu-se exclusivamente ao estudo imunohistoquímico, com recurso a Ac que identificam estes elementos.

Como referido anteriormente, existem vários Ac específicos para a micróglia, mas os utilizados com maior frequência na literatura são o Ac anti-CD68, o Ac anti-MHC II e o Ac anti-IBA-1, razão pela qual foram estes os utilizados no estudo.

A maioria destes Ac marca simultaneamente a micróglia, os macrófagos “residentes no SNC” e os macrófagos provenientes da circulação sanguínea, o que torna difícil distinguir estes elementos entre si. Daí que se procure, também, perceber se existem marcações imunohistoquímicas diferenciais entre os três Ac, de modo a determinar quais, se é que existem, os mais específicos para um determinado elemento celular.

II. Objectivos do estudo

1. Objectivo geral

De acordo com o exposto é possível perceber que existe ainda um relativo desconhecimento sobre o papel da micróglia no “microambiente tumoral” dos tumores gliais. Os estudos histopatológicos publicados apresentam algumas limitações, nomeadamente no que se refere ao facto de serem compostos por pequenas amostras e, maioritariamente, por um subtipo de gliomas (apenas os GBM). Por outro lado, não há referência consistente acerca da distribuição da micróglia, não só nesse “microambiente”, como também nas diferentes zonas que compõem habitualmente a amostra tecidular proveniente das ressecções cirúrgicas, a saber, zona tumoral (ZT), zona de invasão (ZI) e parênquima normal (ZN).

Assim sendo, com base no tipo de estudos passíveis de serem realizados num Laboratório de Neuropatologia (LN), neste caso o do Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE - Hospital de Santa Maria (CHLN – HSM), o presente trabalho teve como principal objectivo a avaliação da expressão da micróglia nos três tipos de tumores gliais e nas zonas atrás referidas, por intermédio do estudo imunohistoquímico de várias amostras arquivadas no LN do CHLN – HSM.

Com este trabalho tentou-se alargar, na medida do possível, os conhecimentos actuais acerca da relação entre a presença da micróglia *versus* tumores gliais.

2. Objectivos específicos

Mais detalhadamente, pretendeu-se com este estudo:

1. Estudar amostras de diversos tipos de tumores gliais com diferentes graus de anaplasia, que contivessem uma ZT, uma ZI envolvente e outra ZN limítrofe, de forma a:

a) Caracterizar quantitativamente a distribuição da micróglia na ZT;

b) Caracterizar quantitativa e qualitativamente a distribuição da micróglia no que respeita aos constituintes desses tecidos (neurónios, astrócitos, oligodendrócitos e vasos) nas ZI e ZN.

2. Comparar a expressão da micróglia entre os tumores gliais e os tumores incluídos na amostra controlo (metástases, meduloblastomas e hemangioblastomas).

3. Estabelecer um padrão de expressão da micróglia para cada tipo de glioma e respectivo grau de anaplasia.

4. Definir quais os Ac mais úteis para a identificação imunohistoquímica da micróglia neste tipo de patologia. Secundariamente, procurar identificar o Ac mais específico para a micróglia.

III. Amostra e metodologia

O estudo realizado foi, ao mesmo tempo, retrospectivo e prospectivo uma vez que os casos diagnosticados no LN no decurso da investigação foram acrescentados aos pertencentes à base de dados existente, de modo a perfazer o número de amostras inicialmente definido. Para cada caso foi recolhida a informação sobre a idade e género do doente, a localização da neoplasia e a data da cirurgia (Anexos 1 e 2).

1. Selecção da amostra

Foram seleccionados, inicialmente, em média, o dobro do número dos casos de tumores gliais idealizados para o estudo, nos diversos graus de anaplasia, de forma a ser possível incluir 10 casos de cada grupo na amostra do estudo. Tal procedimento residiu no facto de nem todos os casos seleccionados inicialmente terem sido incluídos no estudo, por motivos que se prenderam com aspectos qualitativos e quantitativos de amostra em relação à metodologia idealizada. O mesmo procedimento foi realizado, também, para cada grupo da amostra controlo (Figura 11). Seleccionados os números histológicos, prosseguiu-se à recolha das respectivas lâminas coradas pela H&E e dos respectivos blocos histológicos (Figura 12A). Nas lâminas de H&E foram marcadas as zonas de interesse correspondentes a ZN, ZI e ZT.



Figura 11. Lâminas de H&E seleccionadas na primeira fase do trabalho. * **H&E** – Coloração de Hematoxilina e Eosina.

Os casos seleccionados corresponderam a amostras relativas a peças de ressecção cirúrgica e a biopsias estereotáxicas (Figura 12B e C).

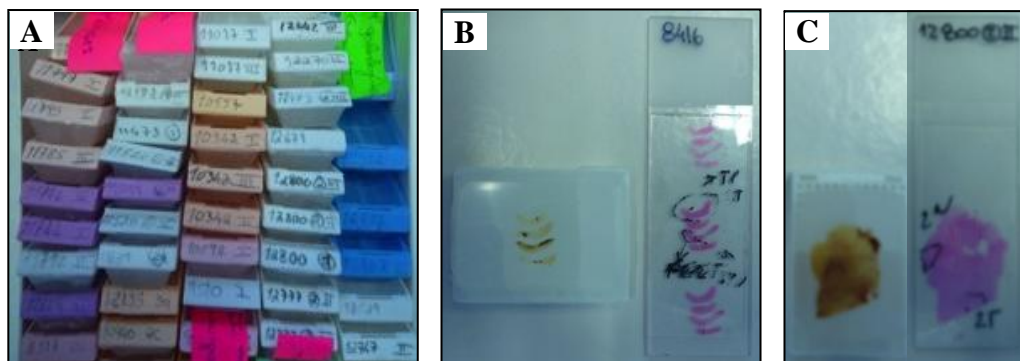


Figura 12. Blocos histológicos (A); Exemplo de um bloco histológico e lâmina correspondentes a uma biopsia estereotáxica (B) e a uma peça cirúrgica (C).

Não foram incluídos casos de recidivas, salvo se o tumor inicial, por qualquer motivo, não tivesse sido considerado.

2. Caracterização da amostra

Os casos de estudo e os de controlo corresponderam a doentes sujeitos a cirurgia no Serviço de Neurocirurgia do CHLN - HSM, entre Outubro de 1998 e Janeiro de 2013.

Foram definidos, no total, 80 casos para estudo correspondentes aos três tipos de tumores gliais (astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas) com os seus diferentes graus de anaplasia. Assim, para os astrocitomas, foram incluídas 10 amostras de cada grau de anaplasia (I a IV), perfazendo um total de 40. Para os oligodendrogliomas e os ependimomas, foram incluídas 10 amostras de cada grau de anaplasia (II a III), num total de 20 para cada um destes tumores (Tabela 6). Apesar de, de acordo com a classificação da OMS, existirem ependimomas de grau I, estes não foram incluídos no trabalho dado que a sua taxa de incidência é muito baixa. Nas amostras de ependimomas, apenas foi estudada a ZT porque,

devido às suas características topográficas, não contêm, habitualmente uma região ZN e/ou ZI.

Tabela 6. Constituição da amostra dos casos em estudo: tamanho da amostra e sua divisão por tipo, sub-tipo e grau de anaplasia do tumor glial.

Tipo de tumor glial	Sub-tipo de glioma	Grau	Número de casos	Total		
Astrocitoma	Astrocitoma pilocítico	I	10	40	80	
	Astrocitoma difuso	II	10			
	Astrocitoma anaplásico	III	10			
	GBM	IV	10			
Oligodendroglioma	Oligodendroglioma de baixo grau	II	10	20		
	Oligodendroglioma anaplásico	III	10			
Ependimoma	Ependimoma de baixo grau	II	10	20		
	Ependimoma anaplásico	III	10			

* **GBM** – Glioblastoma multiforme.

Os controlos consistiram em três tipos de tumores não gliais e um grupo de casos de cirurgia de epilepsia (Tabela 7). Os tumores incluídos foram 10 metástases de adenocarcinomas de pulmão e de mama, 13 meduloblastomas e 14 hemangioblastomas. Estes foram incluídos para comparar, exclusivamente, com a ZT dos casos do estudo. Incluíram-se ainda 15 amostras de cirurgia de epilepsia que se destinaram a servir de controlo da ZN. Assumiu-se que, apesar de haver patologia nestes casos, o tecido removido cirurgicamente permite visualizar, normalmente, parênquima cerebral bem afastado da lesão e, por conseguinte, pelo menos pelo recurso à H&E, julgado histologicamente normal.

Tabela 7. Constituição da amostra controlo: tamanho da amostra e divisão por tipo e sub-tipo de tecido.

Tipo de tecido	Sub-tipo de tecido	Número de casos		Total	
Metástase	Metástase de tumor da mama	5	10	37	52
	Metástase de tumor do pulmão	5			
Meduloblastoma	-	13			
Hemangioblastoma	-	14			
Cirurgia de epilepsia	-	15		15	

Relativamente às principais características demográficas da amostra dos casos em estudo a idade dos doentes variou consideravelmente (1 a 83 anos), com uma média de 40 anos. A média de idades dos astrocitomas foi de 41 anos (3 a 83), dos oligodendrogliomas de 51 anos (1 a 78) e dos ependimomas de 23 anos (1 a 62). Houve mais casos do género masculino (43) do que do género feminino (37).

A média dos controlos tumorais (metástases, meduloblastomas e hemangioblastomas) foi de 43 anos (5 a 83), numa relação de 17 mulheres para 20 homens, e dos casos de epilepsia foi de 41 anos (17 a 76), dos quais 9 eram mulheres e 6 homens (Tabela 8).

Em termos de localização preferencial dos casos e controlos incluídos na amostra, os astrocitomas pilocíticos, os meduloblastomas e os hemangioblastomas, na sua maioria, eram cerebelares. Os astrocitomas difusos e os oligodendrogliomas anaplásicos eram maioritariamente dos lobos temporais, ao passo que os astrocitomas anaplásicos e os oligodendrogliomas de baixo grau eram frontais. Os GBM e as metástases apresentaram uma grande variabilidade topográfica.

Tabela 8. Caracterização da amostra: intervalo de idades e média de idades (anos), e frequência de género de cada grupo do estudo.

Grupo		Intervalo de idades (anos)	Média de dades (anos)	Média de idades (anos)	Número de mulheres		Número de homens	
Casos	Astrocitomas pilocíticos	[3-36]	19	40	4	17	6	23
	Astrocitomas difusos	[12-59]	39		5		5	
	Astrocitomas anaplásicos	[26-60]	41		6		4	
	GBM	[27-83]	60		2		8	
	Oligodendrogliomas baixo grau	[1-68]	41	51	4	10	6	10
	Oligodendrogliomas anaplásicos	[33-78]	61		6		4	
	Ependimomas baixo grau	[15-62]	41	23	4	10	6	10
	Ependimomas anaplásicos	[1-10]	5		6		4	
Controlos	Metástases	[40-70]	60	42	7	17	3	20
	Meduloblastomas	[5-42]	17		1		12	
	Hemangioblastomas	[23-83]	50		9		5	
		Cirurgias de epilepsia	[17-76]	28		9		6

* **GBM** – Glioblastoma multiforme.

Os ependimomas de baixo grau eram maioritariamente intramedulares e os anaplásicos estavam localizados no IV ventrículo. Finalmente, os casos de cirurgia de epilepsia corresponderam a ressecções feitas aos lobos temporais.

3. Procedimento laboratorial

As amostras de tecido estudadas no LN, provenientes do bloco operatório do Serviço de Neurocirurgia são recebidas já numa solução de formol tamponado a 10%, o que permite o início da sua fixação logo após a remoção cirúrgica. Este procedimento é importante pois possibilita a preservação das características morfológicas dos tecidos e favorece a sua manipulação. O tempo de fixação é variável consoante a dimensão da amostra, tendo as biopsias um tempo de fixação inferior às peças cirúrgicas.

Após a fixação foram seleccionadas as áreas mais representativas para o restante processamento. No caso das biopsias, todo o material foi processado.

As amostras foram colocadas em cassetes e o processamento seguinte ocorreu num processador automático vertical. Nele, passaram por banhos sucessivos de álcool a 70%, álcool a 96% e álcool a 100% (processo de desidratação), xilol (processo de diafanização) e de parafina líquida (processo de impregnação).

Neste trabalho, os procedimentos habituais até à montagem dos blocos, quer das amostras mais antigas (cujos blocos se encontravam arquivados no LN), quer dos casos prospectivos, ficaram a cargo dos técnicos do LN. Após a selecção dos blocos correspondentes aos casos em estudo e aos controlos, procedeu-se ao seu corte no micrótomos de Minot.

De cada bloco foram feitos seis cortes a 3µm (espessura padronizada), dois deles cortados apenas como reserva, e colocados em lâminas adesivadas *Superfrost® Plus*, num processo com várias etapas, a saber: 1) à medida que o bloco foi cortado (Figura 13A), os cortes de parafina foram colocados em água fria (Figura 13B) e retirados um por um com lâminas, às quais aderiram (Figura 13C); 2) já nas lâminas, os cortes foram passados por água

quente (aproximadamente 45°C), de forma a expandirem o máximo possível (Figura 13D); 3) as lâminas finais, depois de secas (Figura 13E), foram numeradas e colocadas num cesto; 4) finalmente, foram levadas à estufa durante 2 horas a 60°C, de modo a promover a aderência completa dos cortes às lâminas.

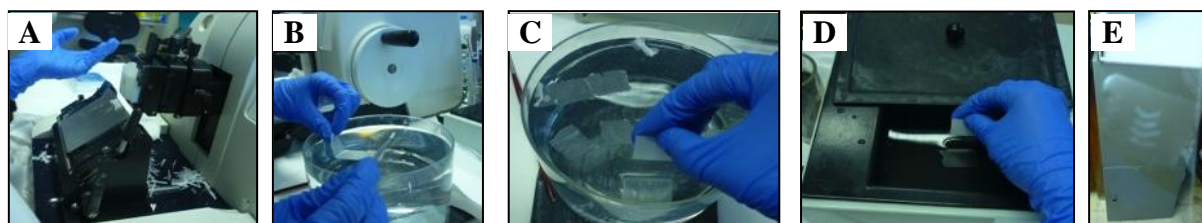


Figura 13. Sequência de corte dos blocos histológicos. Montagem do bloco no porta-blocos (A); Expansão dos cortes na água fria após corte do bloco (B); Remoção dos cortes da água fria com a lâmina (C); Expansão dos cortes em banho-maria (D); Montagem da lâmina final (E).

3.1. Técnica de coloração de Hematoxilina & Eosina

Retiradas as lâminas da estufa, foram colocadas em solução de xilol durante 10 minutos de forma a desparafinar, seguindo-se a hidratação.

Após a desparafinação das lâminas, as destinadas à H&E seguiram para a bateria de coloração:

1. Inicialmente, passaram por três banhos sucessivos de álcool a 100%, 96% e 70% para a sua hidratação (Figura 14);
2. Durante 2 minutos permaneceram em Hematoxilina de Harris, corante básico com afinidade para os núcleos (ácidos), de forma corá-los com uma cor violeta;
3. Para remover o excesso de Hematoxilina passaram-se as lâminas em ácido clorídrico a 1%;
4. De forma a alcançar uma coloração azul nos núcleos, passaram-se as lâminas por água amoniacal para diferenciá-los dos componentes básicos;

5. Em seguida, e para corar o citoplasma, de forma a haver contraste com as estruturas acídicas das células, coraram-se as lâminas com Eosina (corante ácido que cora os componentes básicos das células, como o citoplasma). As estruturas coradas adquiriram uma cor rosa;

6. Após a coloração, seguiu-se a desidratação através da passagem por álcool a 95% e por 3 passagens em álcool a 100%.

7. As lâminas foram colocadas em xilol para posterior montagem em entellan.

3.2. Técnica de imunohistoquímica

As lâminas destinadas à técnica imunohistoquímica também foram colocadas em solução de xilol durante 10 minutos de forma a desparafinar, seguindo-se a hidratação (ver Figura 14).

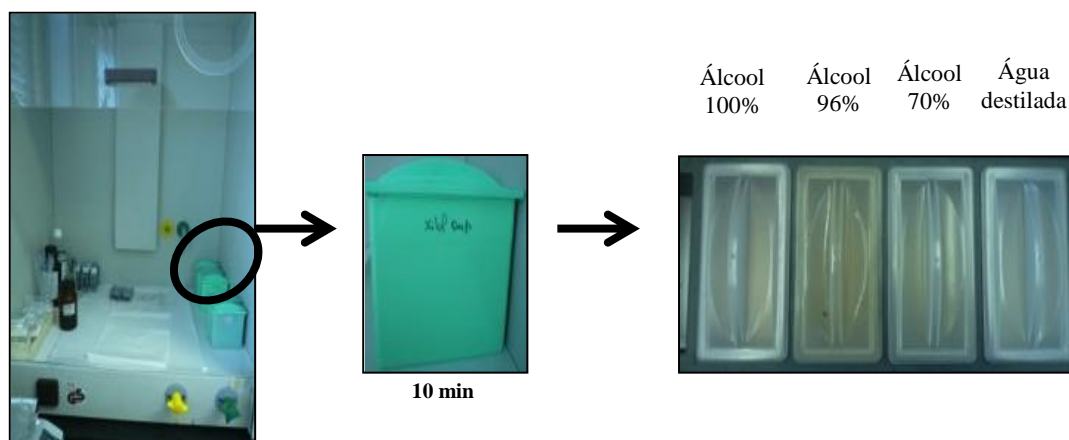


Figura 14. Sequência de desparafinação das lâminas, desde a solução de xilol, na hotte, até à sua total hidratação.

De seguida realizou-se a inibição da enzima peroxidase endógena, presente em alguns tecidos e células, como é o caso dos eritrócitos, células musculares e renais. A necessidade de realizar o processo de inibição da peroxidase endógena deve-se ao facto de, durante a técnica

imunohistoquímica, ser utilizado um Ac secundário, ao qual estão acopladas moléculas enzimáticas, entre as quais peroxidases (*HorseRadish Peroxidases* - HRP). Aquando do processo de revelação, pode ocorrer uma marcação de fundo não específica, já que o revelador irá reagir não apenas com as HRP do Ac secundário, mas também com a peroxidase endógena existente nos tecidos.

Esta inibição é feita com tratamento das lâminas com peróxido de hidrogénio (H_2O_2) antes da incubação com os Ac. O H_2O_2 consiste no substrato da peroxidase e, ao colocá-lo em excesso, promove-se o bloqueio da actividade enzimática da peroxidase por saturação das ligações enzima-substrato (Figura 15). Neste trabalho, procedeu-se à incubação das lâminas em solução do H_2O_2 a 3% durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada.

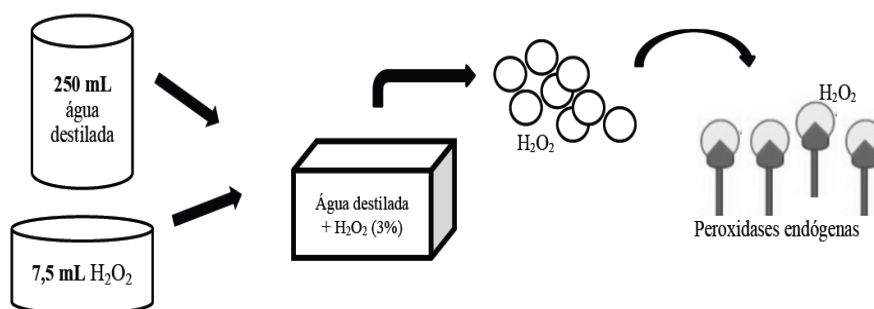


Figura 15. Esquema da fase de inibição da peroxidase endógena. * H_2O_2 – Peróxido de hidrogénio.

Os processos de fixação e inclusão necessários para a realização das técnicas histológicas de rotina em neuropatologia são responsáveis por mascarar alguns epítomos antigénicos, ligar-se a eles ou destruí-los. Torna-se necessário, portanto, reverter esta situação de forma a tornar possível o acesso do Ac ao epítopo-alvo, num processo chamado recuperação antigénica. Este processo foi executado a altas temperaturas, com recurso a microondas. Foram feitos dois ciclos, com diferentes tempos e potências: 10 minutos a 600

Watts, seguido de 20 minutos a 850 Watts. A solução usada foi o tampão citrato de pH alto (*Vector Laboratories, Inc*) (Figura 16).

De seguida, as lâminas foram lavadas com tampão *Phosphate Buffer Saline* (PBS), passando-se à técnica de detecção propriamente dita, que se iniciou com a incubação com os Ac primários, os quais se ligam especificamente às proteínas (epítomos dos Ag específicos) do elemento a detectar no tecido (neste caso, a microglia e os macrófagos).

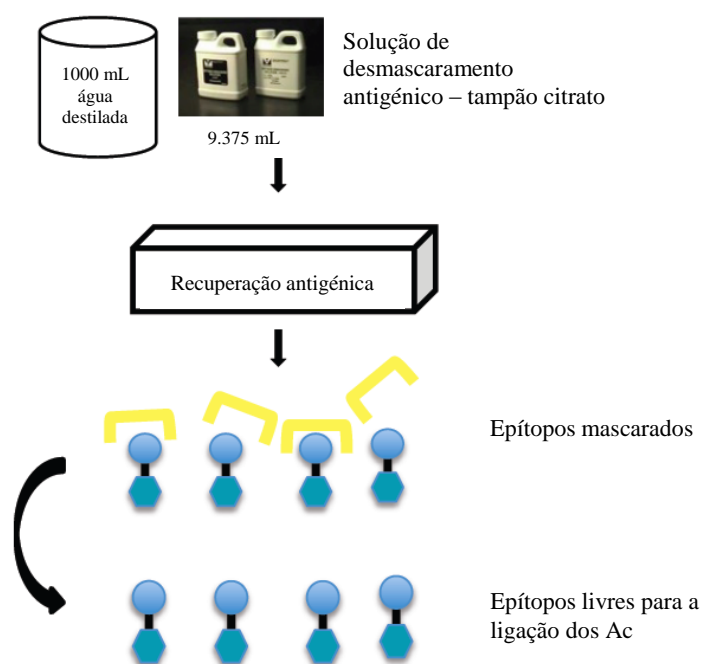


Figura 16. Esquema da fase de recuperação antigénica. * Ac – anticorpo/s.

Para cada caso em estudo e controlo foram feitas três lâminas que corresponderam às marcações imunohistoquímicas com os diferentes Ac primários monoclonais de ratinho: anti-CD68, anti-MHC II e anti-IBA-1, cujas características se encontram discriminadas nas Tabelas 9 e 10. A solução de diluição utilizada foi a *Bovine Serum Albumin* (BSA) a 1%, tendo sido preparados 200 µL de Ac primário por lâmina.

Os protocolos foram otimizados no LN e padronizados para os Ac usados neste trabalho (Tabela 9).

Tabela 9. Caracterização dos Ac primários utilizados no estudo.

Ac	Clone	Marca	Referência	Alvo celular
Anti-CD68	PG-M1	<i>DakoCytomation</i>	M0876	Micróglia e macrófagos
Anti-MHC II	CR3/43	<i>DakoCytomation</i>	M0775	Micróglia e macrófagos activados
Anti-IBA-1	-	<i>Santa Cruz Biotechnonology</i>	(1022-5): sc- 32725	Micróglia

***CD68** – *Cluster of Differentiation68*; **IBA-1** – *Ionized calcium Binding Adapter molecule-1*; **MHC II** – *Major Histocompatibility Complex - class II*.

A técnica imunohistoquímica diferiu entre os três Ac primários, no que respeita às diluições e ao polímero indirecto usados, bem como aos tempos de cada fase de incubação (Tabela 10).

Tabela 10. Técnica imunohistoquímica.

Ac primário	Diluição	Tempo de incubação (Ac primário)	Polímero indirecto (Ac secundários + HRP)	Tempo de incubação (polímero indirecto)
Anti-CD68	1:100	1 hora	<i>EnVision</i> [®]	1 hora
Anti-MHC II	1:1000	1 hora	<i>EnVision</i> [®]	1 hora
Anti-IBA-1	1:40	<i>Overnight</i>	<i>NovoLink</i> [®]	45 min + 45 min

* **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – *Cluster of Differentiation68*; **HRP** - *HorseRadish Peroxidases*; **IBA-1** – *Ionized calcium Binding Adapter molecule-1*; **MHC II** – *Major Histocompatibility Complex - class II*.

No caso dos Ac anti-CD68 e anti-MHC II a incubação decorreu, para toda a amostra, durante 1 hora à temperatura ambiente, à qual se seguiram duas lavagens de 10 minutos com tampão PBS. No caso do Ac primário anti-IBA-1, a incubação foi feita durante a noite, a 4°C.

O aumento do tempo de incubação deste Ac prendeu-se com a necessidade de maximizar as ligações específicas entre este Ac e o seu epítipo. Posteriormente foram também efectuadas duas lavagens de 10 minutos com tampão PBS.

O passo seguinte da técnica imunohistoquímica foi a incubação com um polímero indirecto, que variou consoante o Ac primário utilizado. No caso dos Ac anti-CD68 e anti-MHC II, a incubação foi feita com o polímero indirecto *EnVision*[®] da *Dako*, durante 1 hora à temperatura ambiente. Este reagente consiste numa estrutura-base polimérica hidrofílica de dextranos à qual foi associado um vasto número de Ac secundários (anti-ratinho) e moléculas de HRP (Figura 17A).

No caso do Ac anti-IBA-1, foi utilizado o polímero indirecto *NovoLink*[®] da *Leica*. Este polímero é composto por dois reagentes, o bloqueador pós-primário e o polímero propriamente dito. Neste caso, o polímero é também uma cadeia polimérica composta por HRP e por Ac secundários, embora as ligações entre os Ac primários e secundários sejam estabelecidas com a ajuda de um bloqueador pós-primário (Figura 17B). A incubação com o bloqueador pós-primário foi feita durante 45 minutos à temperatura ambiente. A função deste é potenciar a penetração do polímero indirecto no tecido e assim favorecer as ligações entre os Ac. Depois de duas lavagens de 5 minutos, incubaram-se as lâminas com o polímero indirecto, novamente durante 45 minutos à temperatura ambiente.

Após duas lavagens de 10 minutos com PBS, a terceira etapa do processo de detecção compreendeu a revelação de 2 minutos com o DAB (3,3'- diaminobenzidina). O sistema é composto por dois componentes: a solução DAB concentrada e o tampão de substrato contendo H₂O₂.

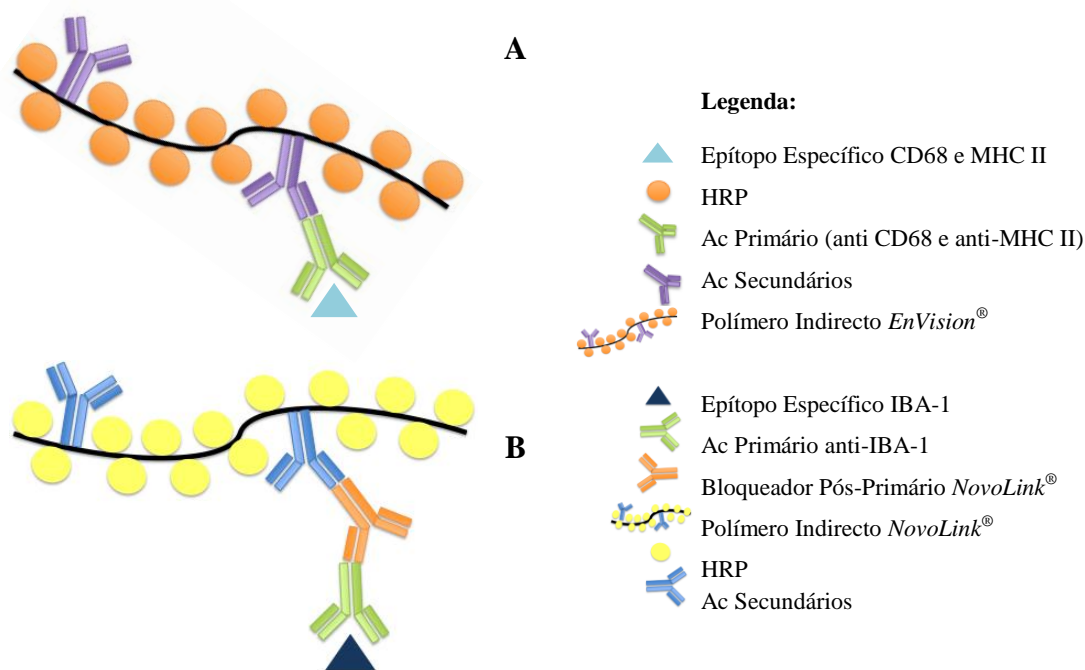


Figura 17. Desenhos ilustrativos dos métodos do polímero indirecto *EnVision*® (A) e do polímero indirecto *NovoLink*® (B). * Ac – Anticorpo/s; **CD68** – Cluster of Differentiation68; **HRP** - HorseRadish Peroxidases; **IBA-1** – Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1; **MHC II** – Major Histocompatibility Complex – class II;

A aplicação deste reagente permite uma reacção entre o DAB e as enzimas HRP do polímero, obtendo-se um produto de cor acastanhada que precipita no local da reacção, permitindo, indirectamente, identificar a estrutura marcada no tecido. Seguidamente, as lâminas foram lavadas em água destilada, contrastadas em Hematoxilina de Harris (para coloração nuclear violeta) e lavadas novamente para retirar o excesso.

O próximo passo consistiu na desidratação das lâminas na bateria de álcoois do LN, composta por três passagens, 70%, 96% e 100%. De seguida as lâminas foram postas em xilol de forma a ser possível a sua montagem com *entellan*. Para confirmar as marcações e a correcta execução da técnica imunohistoquímica, as lâminas foram observadas ao microscópio.

Toda a técnica de imunohistoquímica foi realizada pela autora do estudo.

4. Análise microscópica

Numa primeira fase, procedeu-se à marcação das três zonas a analisar nas lâminas de imunohistoquímica, tendo as de H&E como referência. A avaliação microscópica foi posteriormente efectuada com recurso ao microscópio óptico *Motic*[®], utilizando-se o programa de processamento de imagens *Motic Images Advanced 3.1.*.

As fotografias foram tiradas numa resolução de 1280 x 1024, com ampliação de 400x. Para cada uma das zonas de interesse foram fotografados três campos microscópicos diferentes a fim de obter maior significância estatística, sendo também escolhidas as mesmas regiões da lâmina para os três Ac.

As fotografias foram analisadas no programa *ImageJ*, no qual se realizou a contagem do número total de núcleos e de células marcadas. Para cada caso, contou-se o número total de núcleos corados pela Hematoxilina e o número total de células marcadas com cada Ac (anti-CD68, anti-MHC II e anti-IBA-1) (Figura 18) para cada zona de interesse (ZN, ZI e ZI) (Figura 19).

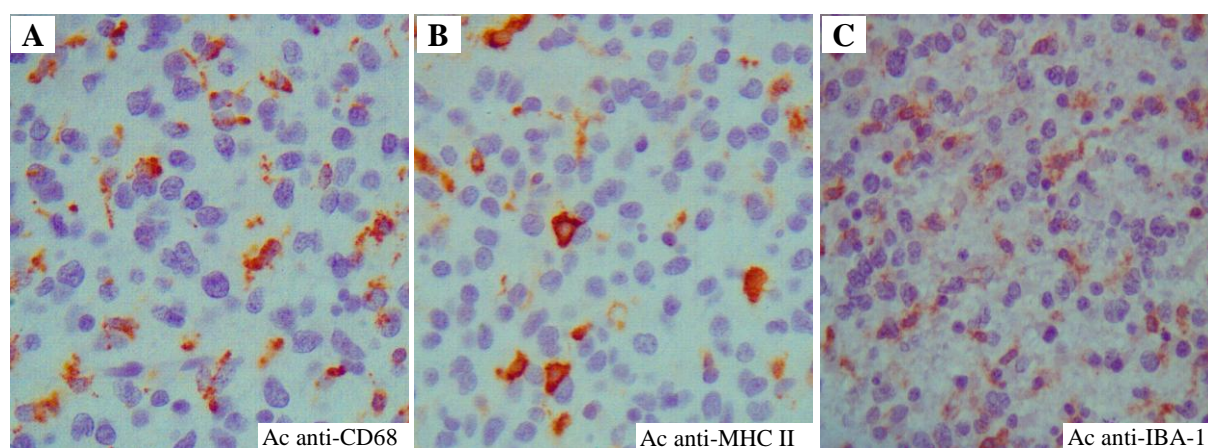


Figura 18. Fotografias de três marcações imunohistoquímicas distintas do trabalho. Marcação de anti-CD68 (A); de anti-MHC II (B); de anti-IBA-1 (C). As três fotografias correspondem a uma ZT de um caso de oligodendroglioma anaplásico. Ampliação de 400X. * Ac – Anticorpo/s; CD68 – Cluster of Differentiation68; IBA-1 – Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1; MHC II – Major Histocompatibility Complex- class II; ZT – Zona Tumoral.

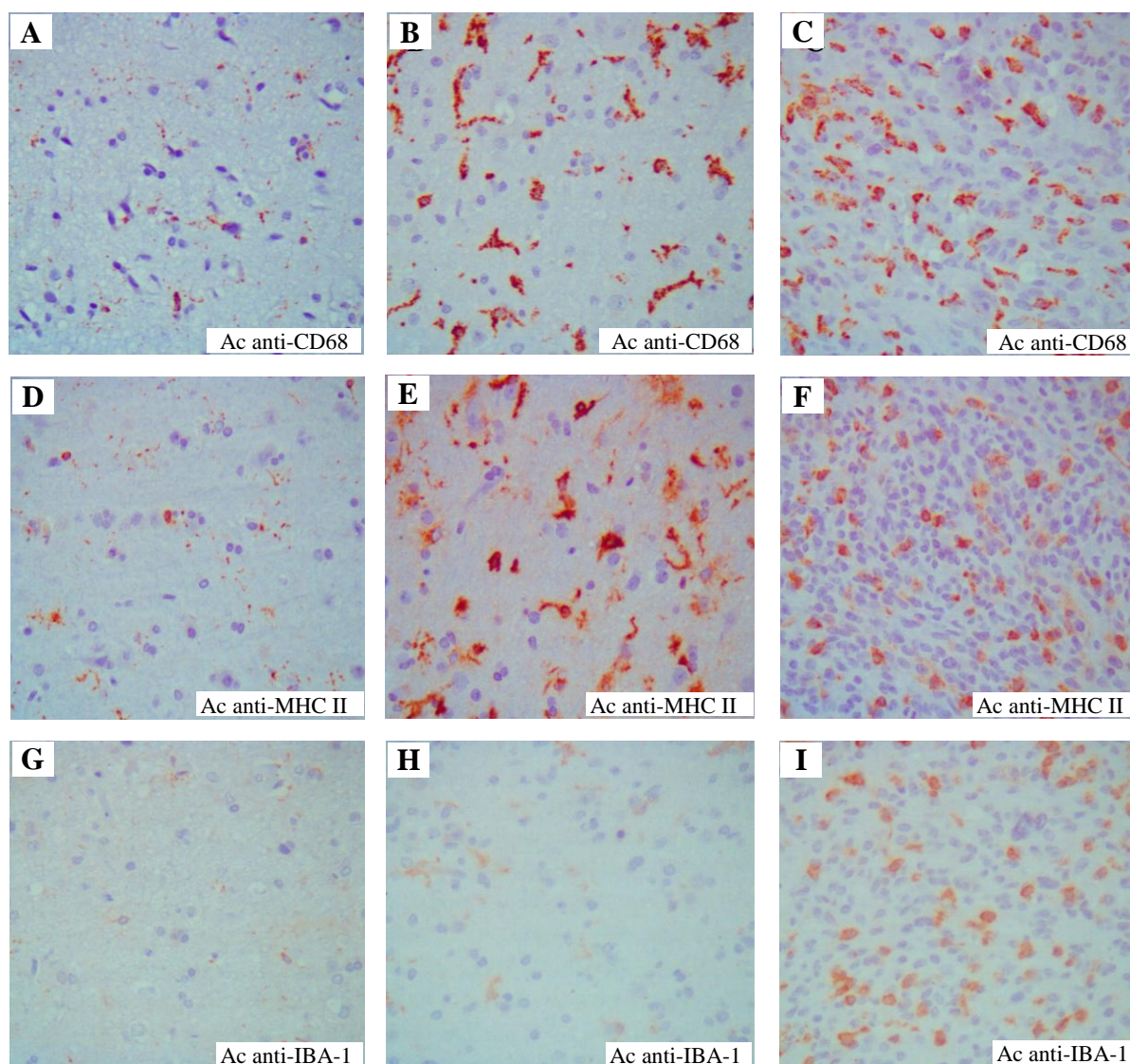


Figura 19. Fotografias das três zonas de estudo em cada marcação imunohistoquímica de um GBM. ZN (A, D e G); ZI (B, E e H); ZT (C, F e I). Ampliação de 400x. * Ac – Anticorpo/s; **CD68** – *Cluster of Differentiation*68; **GBM** – Glioblastoma Multiforme; **IBA-1** – *Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1*; **MHC II** – *Major Histocompatibility Complex - class II*; **ZN**- Zona Normal; **ZI** – Zona de Invasão; **ZT** – Zona Tumoral.

5. Análise estatística

Para a análise dos resultados foi usado o programa IBM SPSS *Statistics 20*, onde se criou a base de dados do trabalho para posterior análise estatística.

Apesar de existirem mais do que dois grupos em análise, as comparações foram feitas duas a duas e os vários grupos não foram comparados em simultâneo, os testes realizados

foram os testes paramétricos *t-Student* para amostras emparelhadas e amostras independentes, isto porque foi objectivo deste trabalho verificar as diferenças (ou semelhanças) entre duas zonas entre si, bem como entre dois grupos e duas marcações imunohistoquímicas, sempre de cada vez.

O teste estatístico *t-Student Paired Samples* foi usado para a comparação das diferentes zonas, sempre duas a duas. As zonas foram admitidas como dependentes umas das outras pois são referentes a uma mesma amostra (remoção cirúrgica referente a um mesmo doente).

Para a comparação de grupos diferentes (por exemplo: Astrocitomas vs. Oligodendrogliomas) e de marcações imunohistoquímicas diferentes utilizou-se o teste estatístico *t-Student Independent Samples*, pelo facto de se estar a comparar a expressão da micróglia numa mesma zona ou um mesmo Ac entre dois grupos independentes.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o *p-value* fosse inferior a 0.05 ($p < 0.05$).

IV. Resultados

Os principais resultados estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Expressão da microglia com cada Ac utilizado, e nas três zonas consideradas para o grupo de estudo e para os casos de controlo.

	Ac	Anti-CD68			Anti-MHC II			Anti-IBA-1		
	Zonas	ZT	ZI	ZN	ZT	ZI	ZN	ZT	ZI	ZN
Casos	Astrocitomas grau I	25.51%	24.27%	17.16%	28.80%	23.33%	11.74%	17.69%	9.79%	2.40%
	Astrocitomas grau II	24.53%	15.78%	8.37%	21.55%	14.02%	4.32%	12.34%	12.91%	5.14%
	Astrocitomas grau III	13.94%	18.40%	10.35%	13.14%	17.58%	9.40%	8.53%	8.21%	2.80%
	Astrocitomas grau IV	17.87%	26.69%	8.42%	14.26%	21.31%	7.03%	6.04%	10.45%	3.69%
	Oligodendrogliomas grau II	8.92%	9.21%	5.04%	9.41%	8.49%	9.47%	6.12%	4.99%	3.80%
	Oligodendrogliomas grau III	11.91%	13.97%	8.09%	9.50%	19.36%	3.64%	3.25%	5.58%	0.91%
	Ependimomas grau II	4.07%	-	-	11.02%	-	-	5.88%	-	-
	Ependimomas grau III	6.46%	-	-	6.55%	-	-	3.39%	-	-
Controlos	Metástases	12.63%	-	-	9.27%	-	-	6.44%	-	-
	Hemangioblastomas	12.94%	-	-	10.91%	-	-	3.66%	-	-
	Meduloblastomas	3.18%	-	-	6.18%	-	-	1.18%	-	-
	Cirurgia de epilepsia	-	-	12.87%	-	-	14.87%	-	-	4.92%

* **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – *Cluster of Differentiation*68; **IBA-1** - *Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1*; **MHC II** - *Major Histocompatibility Complex -class II*; **ZI** – Zona de Invasão; **ZN** – Zona Normal; **ZT** – Zona Tumoral.

Com base nestes, procurou-se caracterizar a expressão da microglia nas três zonas em estudo, procurando perceber se existiram diferenças na percentagem de células marcadas; nas diferentes amostras em estudo, comparando por exemplo os grupos de gliomas, gliomas e casos normais, e gliomas e controlos tumorais; nas diferentes zonas e nas diferentes marcações imunohistoquímicas com o objectivo de perceber se algum dos Ac seria mais específico para este tipo celular.

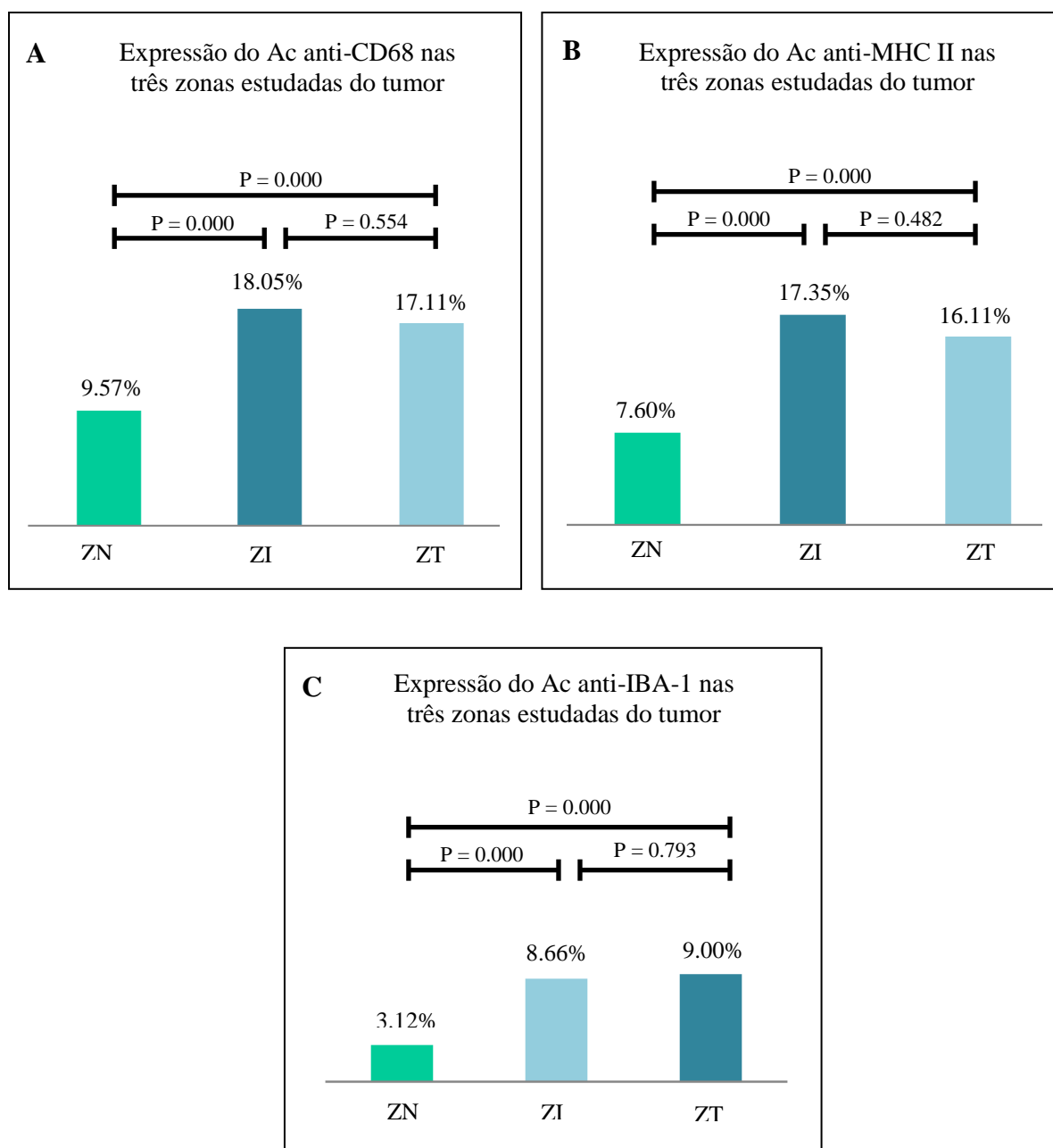
1. Expressão da micróglia nas zonas em estudo

Para a comparação da expressão da micróglia nas zonas da amostra foram incluídos os 40 casos de astrocitomas (grau I a IV) e os 20 oligodendrogliomas (grau II e III), num total de 60 casos. Foram excluídos os ependimomas pelo facto já referido de as amostras respectivas apenas conterem ZT. A análise revelou que: com os Ac anti-CD68 e anti-MHC II existiu um padrão de marcação semelhante, com a ZI a apresentar uma maior expressão de micróglia (18.05% e 17.35%, respectivamente), seguida da ZT (17.11% e 16.11%, respectivamente) e da ZN (9.57% e 7.60%, respectivamente) (Gráfico 1A e B); com o Ac anti-IBA-1, a maior expressão da micróglia ocorreu na ZT (9.00%), seguida da ZI (8.66%) e da ZN (3.12%) (Gráfico 1C).

Para os três Ac encontraram-se diferenças significativas entre as ZN e ZI ($p = 0.000$) e entre as ZN e ZT ($p = 0.000$). Entre as ZI e ZT não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (CD68: $p = 0.554$; MHC II: $p = 0.482$; IBA-1: $p = 0.793$) (Gráfico 1).

Subdividindo os casos em estudo pelo tipo de tumor glial (astrocitomas e oligodendrogliomas) verificou-se que, genericamente, os padrões de expressão da micróglia foram semelhantes ao descrito anteriormente. Assim, no caso dos astrocitomas, a expressão da micróglia com o Ac anti-CD68 foi de 11.08% na ZN, 20.46% na ZT e de 21.29% na ZI, com o Ac anti-MHC II foi de 8.12% na ZN, 19.07% na ZI e 19.44% na ZT e, finalmente, com o Ac anti-IBA-1 foi de 3.51% na ZN, 10.34% na ZI e 11.15% na ZT. Para os oligodendrogliomas, a expressão da micróglia para os três Ac foi superior na ZI, seguida da ZT e da ZN.

Gráfico 1. Expressão da microglia no conjunto dos tumores gliais e nas três zonas estudadas.



* **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – Cluster of Differentiation68; **IBA-1** - Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1; **MHC II** - Major Histocompatibility Complex - class II; **ZI** – Zona de Invasão; **ZN** – Zona Normal; **ZT** – Zona Tumoral.

No que respeita a significâncias estatísticas, verificou-se que: nos astrocitomas existiram diferenças estatisticamente significativas entre as ZN e ZI e entre as ZN e ZT, independentemente do Ac, enquanto nos oligodendrogliomas apenas existiu significância estatística entre as ZN e ZI, para os três Ac em estudo (Tabela 12).

Tabela 12. Significâncias estatísticas ocorridas nos astrocitomas e nos oligodendrogliomas relativas às comparações da expressão da micróglia de cada zona e para os três Ac.

Ac	Zonas	Astrocitomas	Oligodendrogliomas
Anti-CD68	ZN - ZI	p-value = 0.000	p-value = 0.024
	ZN - ZT	p-value = 0.000	p-value = 0.144
	ZI - ZT	p-value = 0.692	p-value = 0.631
Anti-MHC II	ZN - ZI	p-value = 0.000	p-value = 0.024
	ZN - ZT	p-value = 0.000	p-value = 0.345
	ZI - ZT	p-value = 0.859	p-value = 0.181
Anti-IBA-1	ZN - ZI	p-value = 0.000	p-value = 0.021
	ZN - ZT	p-value = 0.000	p-value = 0.147
	ZI - ZT	p-value = 0.651	p-value = 0.708

* **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – *Cluster of Differentiation68*; **IBA-1** - *Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1*; **MHC II** - *Major Histocompatibility Complex - class II*; **ZI** – Zona de Invasão; **ZN** – Zona Normal; **ZT** – Zona Tumoral.

Na tentativa de verificar se existiriam diferenças de expressão consoante o grau de anaplasia dos tumores gliais, analisaram-se os padrões de expressão dos quatro graus dos astrocitomas e dos dois dos oligodendrogliomas.

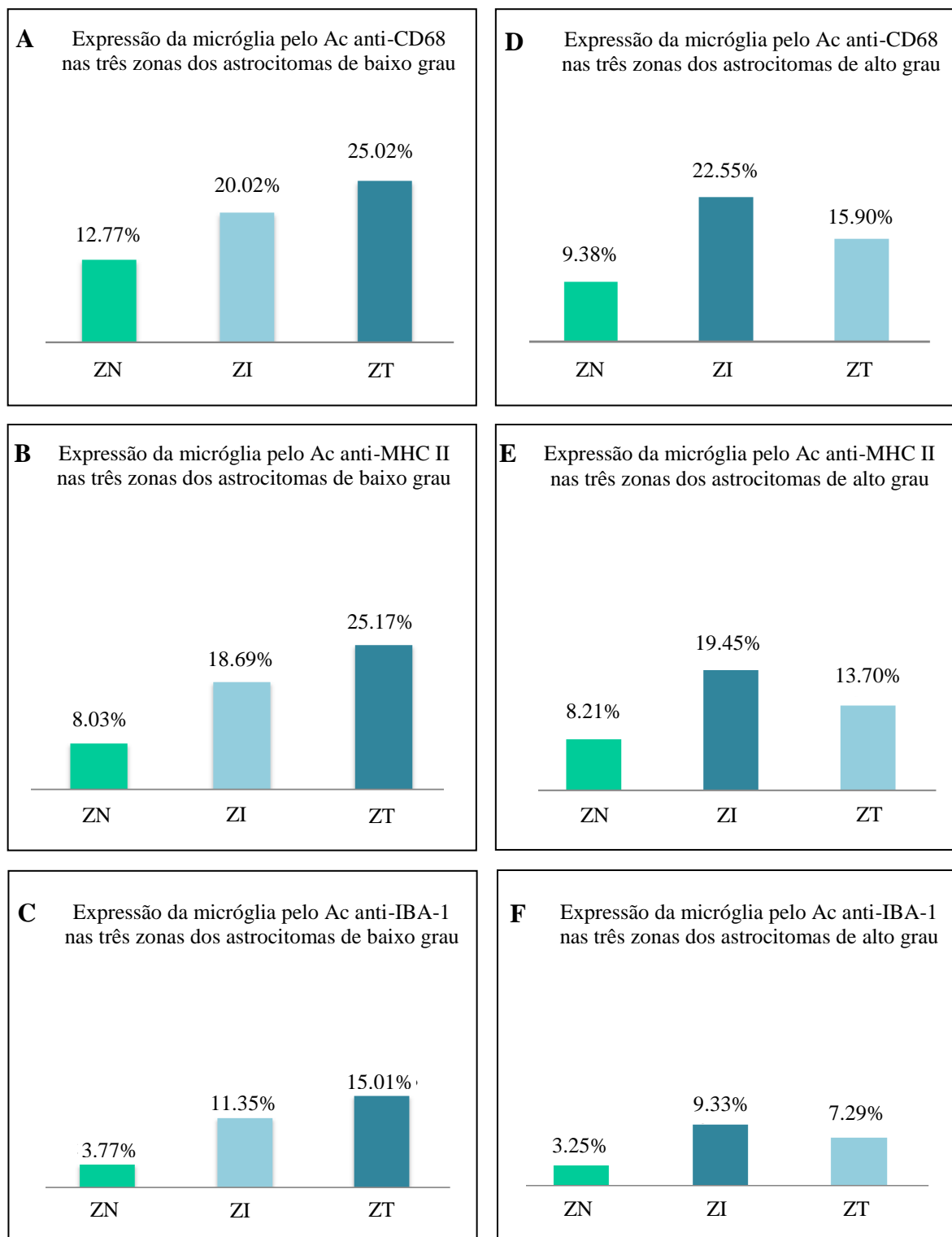
Para os 40 astrocitomas, pôde observar-se uma diferença no padrão da expressão da micróglia entre os de baixo (grau I e II) e os de alto grau (grau III e IV). Nos primeiros, a expressão da micróglia foi superior na ZT, seguida da ZI e da ZN, para os três Ac. Na ZT, a expressão da micróglia com marcação do Ac anti-CD68 foi de 25.02%, na ZI de 20.02% e na

ZN de 12.77%. Na marcação com o Ac anti-MHC II, observaram-se 25.17% de células da micróglia na ZT, 18.69% na ZI e 8.03% na ZN. Por fim, na marcação com o Ac anti-IBA-1, na ZT houve 15.01% de expressão da micróglia, seguida de 11.35% na ZT e de 3.77% na ZN (Gráfico 2A, B e C). Para os de alto grau, a ZI apresentou maior expressão de micróglia, em relação às ZN e ZT, e sempre para os três Ac. Na marcação com o Ac anti-CD68, a expressão da micróglia foi de 22.55% na ZI, de 15.90% na ZT e de 9.38% na ZN. Com a marcação anti-MHC II, foi de 19.45% na ZI, de 13.70% na ZT e de 8.21% na ZN. Finalmente, na marcação com o Ac anti-IBA-1 foi de 9.33% na ZI, 7.29% na ZT e 3.25% na ZN (Gráfico 2D, E e F).

Comparando a mesma zona entre os dois grupos de tumores, nas três marcações imunohistoquímicas, verificou-se que a percentagem de células da micróglia marcadas nos astrocitomas de baixo e alto grau não foi significativamente diferente na ZN (Ac anti-CD68: $p = 0.217$; Ac anti-MHC II: $p = 0.942$; Ac anti-IBA-1: $p = 0.722$) e na ZI (Ac anti-CD68: $p = 0.373$; Ac anti-MHC II: $p = 0.810$; Ac anti-IBA-1: $p = 0.477$). No entanto, houve diferenças estatisticamente significativas entre a expressão da micróglia na ZT dos astrocitomas de baixo grau, quando comparada com a ZT dos de alto grau (Ac anti-CD68: $p = 0.007$; Ac anti-MHC II: $p = 0.002$; Ac anti-IBA-1: $p = 0.016$).

Relativamente aos oligodendrogliomas, os de grau II pareceram não ter um padrão específico, sendo a expressão da micróglia superior na ZI com a marcação do Ac anti-CD68 (9.21%), na ZN com marcação do Ac anti-MHC II (9.47%) e na ZT com marcação do Ac anti-IBA-1 (6.12%). Em oposição, nos oligodendrogliomas anaplásicos, a expressão foi sempre superior na ZI, seguida da ZT e da ZN, para os três Ac (Tabela 13).

Gráfico 2. Expressão da micróglia nos astrocitomas de baixo (A, B e C) e alto grau (D, E e F).



* **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – *Cluster of Differentiation 68*; **IBA-1** - *Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1*; **MHC II** - *Major Histocompatibility Complex - class II*; **ZI** – Zona de Invasão; **ZN** – Zona Normal; **ZT** – Zona Tumoral.

Tabela 13. Percentagens relativas da expressão da micróglia nos oligodendrogliomas de baixo e de alto grau de anaplasia, com os três Ac e em cada uma das três zonas alvo.

Ac	Anti-CD68			Anti-MHC II			Anti-IBA-1		
Zonas	ZN	ZI	ZT	ZN	ZI	ZT	ZN	ZI	ZT
Oligodendroligomas baixo grau	5.04%	9.21%	8.92%	9.47%	8.49%	9.41%	3.80%	4.99%	6.12%
Oligodendrogliomas anaplásicos	8.09%	13.97%	11.91%	3.64%	19.36%	9.50%	0.91%	5.58%	3.25%

* **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – *Cluster of Differentiation 68*; **IBA-1** - *Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1*; **MHC II** - *Major Histocompatibility Complex - Class II*; **ZI** – Zona de Invasão; **ZN** – Zona Normal; **ZT** – Zona Tumoral.

As diferenças entre a expressão da micróglia, num caso de GBM com o Ac anti-MHC II, nas três zonas são demonstradas na Figura 20.

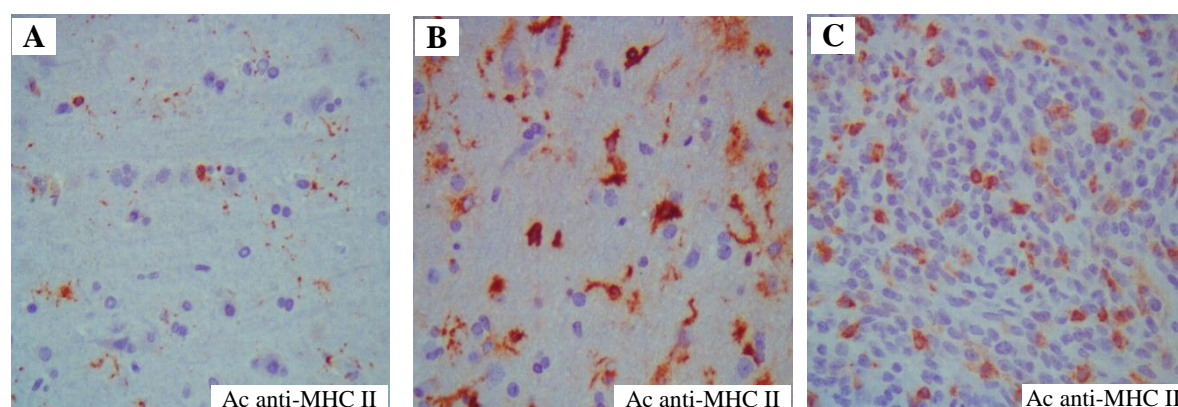


Figura 20. Expressão da micróglia com o Ac anti-MHC II nas ZN (A), ZI (B) e ZT (C) de um GBM incluído na amostra. Ampliação de 400x. ***Ac** – Anticorpo/s; **GBM** – Glioblastoma Multiforme; **MHC II** - *Major Histocompatibility Complex - class II*; **ZI** – Zona de Invasão; **ZN** – Zona Normal; **ZT** – Zona Tumoral.

2. Comparação da expressão da micróglia entre os tumores gliais em estudo e os grupos de controlo

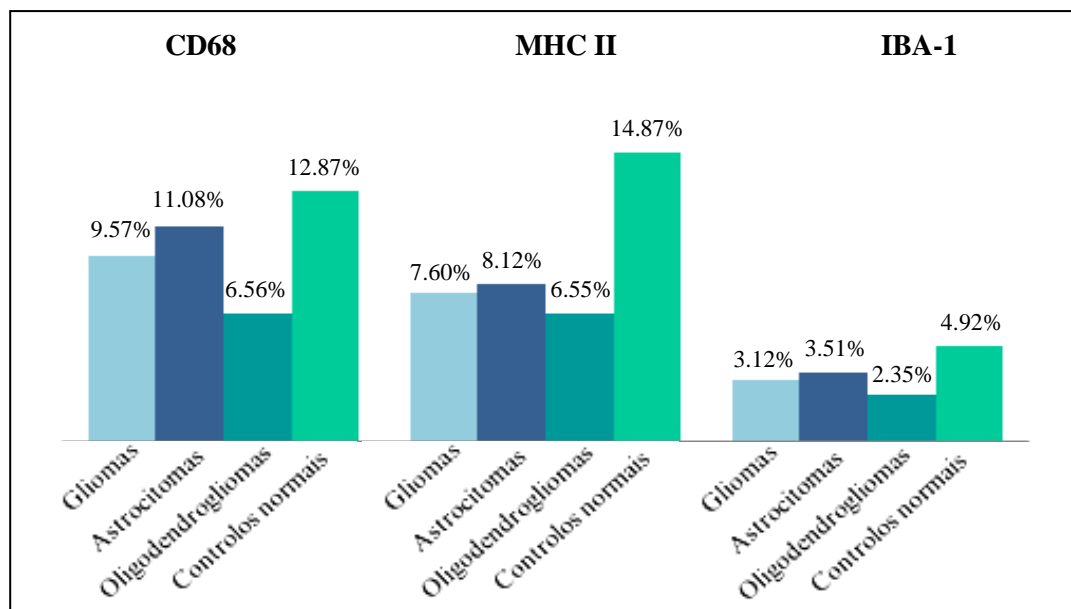
Outro dos objectivos consistiu na análise comparativa da expressão da micróglia entre os tumores gliais e os controlos, de forma a perceber se, de algum modo, a resposta microglial

teria alguma especificidade para os gliomas. Para esta análise, foi utilizada a expressão da micróglia nas ZN e ZT dos tumores gliais.

2.1. Tumores gliais vs. Controlos normais

A comparação da expressão da micróglia na ZN foi feita entre os gliomas (astrocitomas e oligodendrogliomas, n = 60) e os controlos normais (amostras de cirurgia de epilepsia, n = 15). No Gráfico 3 estão descritos os principais resultados obtidos, referindo apenas a percentagem de micróglia presente em cada um dos grupos.

Gráfico 3. Expressão dos três Ac da micróglia na ZN dos tumores gliais em estudo e nos controlos normais.



+ **Gliomas** – inclui astrocitomas e oligodendrogliomas como um só grupo (n = 60). * **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – *Cluster of Differentiation 68*; **IBA-1** – *Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1*; **MHC II** – *Major Histocompatibility Complex - class II*; **ZN** – Zona Normal.

Observou-se que, independentemente do Ac utilizado, existiu sempre uma maior expressão de micróglia nas amostras controlo, comparativamente aos gliomas (Ac anti-CD68: 12.87% vs 9.57%; Ac anti-MHC II: 14.87% vs 7.60%; Ac anti-IBA-1: 4.92% vs 3.12%, respectivamente). Nas marcações com o Ac anti-CD68 e com o Ac anti-IBA-1, não foram

encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p = 0.198$; $p = 0.133$, respectivamente), ao contrário da marcação com o Ac anti-MHC II, que teve significado estatístico ($p = 0.004$).

Analisando os astrocitomas isoladamente ($n = 40$), verificou-se que o padrão quantitativo da marcação para os três Ac se manteve quando comparado com o dos controles normais. Na marcação com Ac anti-CD68, a expressão de micróglia foi de 11.08%, ao passo que nos controles normais foi de 12.87% ($p = 0.502$). Na marcação com Ac anti-MHC II, 8.12% do total de células dos astrocitomas eram células da micróglia, enquanto nas dos controles foi de 14.87%, com relevância estatística ($p = 0.011$). Finalmente, na marcação com o Ac anti-IBA-1, a percentagem de células da micróglia foi de 3.51% nos astrocitomas e de 4.92% nos controles ($p = 0.264$).

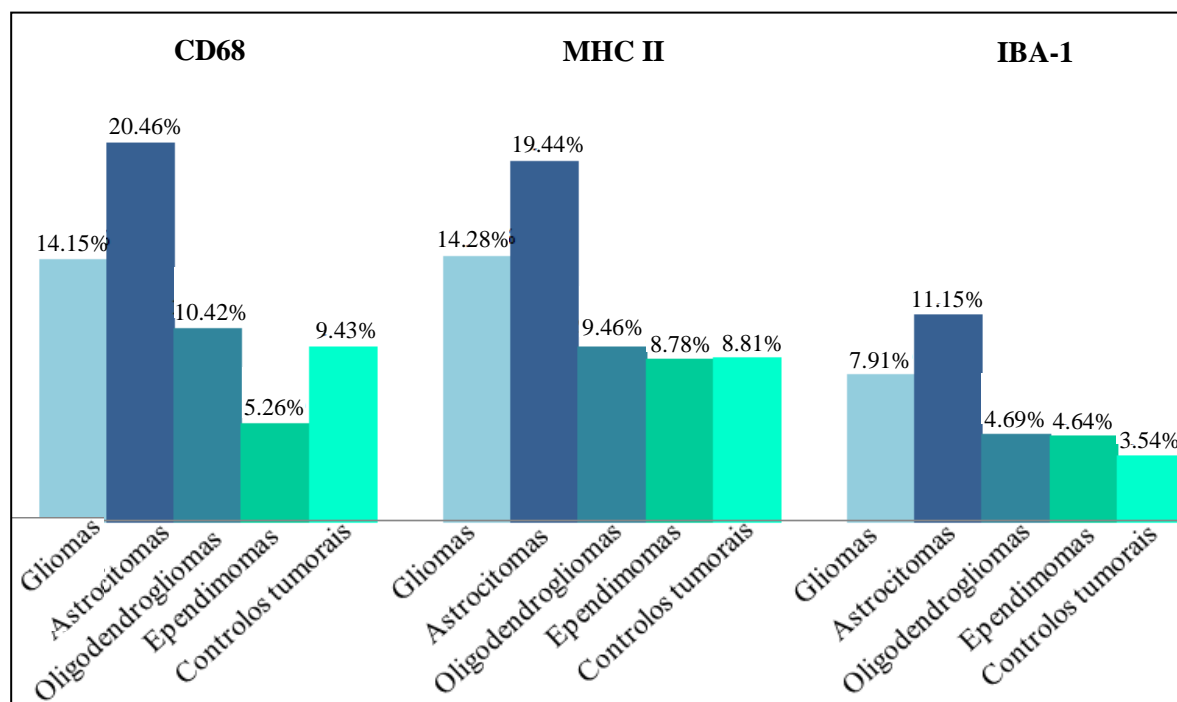
Em relação à expressão da micróglia nas ZN dos oligodendrogliomas e dos controles, foi observado um padrão quantitativo semelhante ao encontrado nas três marcações imunohistoquímicas entre os astrocitomas e os controles. Com os Ac anti-CD68, anti-MHC II e anti-IBA-1, os controles apresentaram uma expressão da micróglia de 12.87%, 14.87% e de 4.92%, respectivamente, e os oligodendrogliomas de 6.56%, 6.55% e 2.35%, respectivamente. Estas diferenças foram, estatisticamente significativas, apenas, nos dois primeiros (Ac anti-CD68: $p = 0.010$; Ac anti-MHC II: $p = 0.015$; Ac anti-IBA-1: $p = 0.059$)

2.2. Tumores gliais vs. Controlos tumorais

A comparação da expressão da micróglia na ZT foi feita entre os tumores gliais (astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas, $n = 80$) e os controlos tumorais (10 metástases, 13 meduloblastomas e 14 hemangioblastomas, $n = 37$).

Neste caso, e para os três Ac, houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, uma vez que nos tumores gliais a expressão da micróglia foi superior à dos controlos (Gráfico 4):

Gráfico 4. Expressão dos três Ac da micróglia na ZT dos tumores gliais em estudo e nos controlos tumorais.



+ **Gliomas** – inclui astrocitomas, oligodendroglomas e ependimomas como um só grupo (n = 80). * **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – Cluster of Differentiation 68; **IBA-1** – Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1; **MHC II** – Major Histocompatibility Complex -class II; **ZT** – Zona Tumoral. ** Resultados com significância estatística.

Na marcação do Ac anti-CD68, a percentagem de expressão de micróglia nos gliomas foi de 14.15%, enquanto nos controlos foi de 9.43%, diferença estatisticamente significativa ($p = 0.012$); para a marcação do Ac anti-MHC II, 14.28% das células nos gliomas corresponderam a micróglia, contrapondo com 8.81% de células marcadas nos controlos, igualmente com significância estatística ($p = 0.014$); para a marcação com o Ac anti-IBA-1, a percentagem de células da micróglia foi de 7.91% nos gliomas e de 3.54% nos controlos, diferença, mais uma vez, estatisticamente significativa ($p = 0.007$).

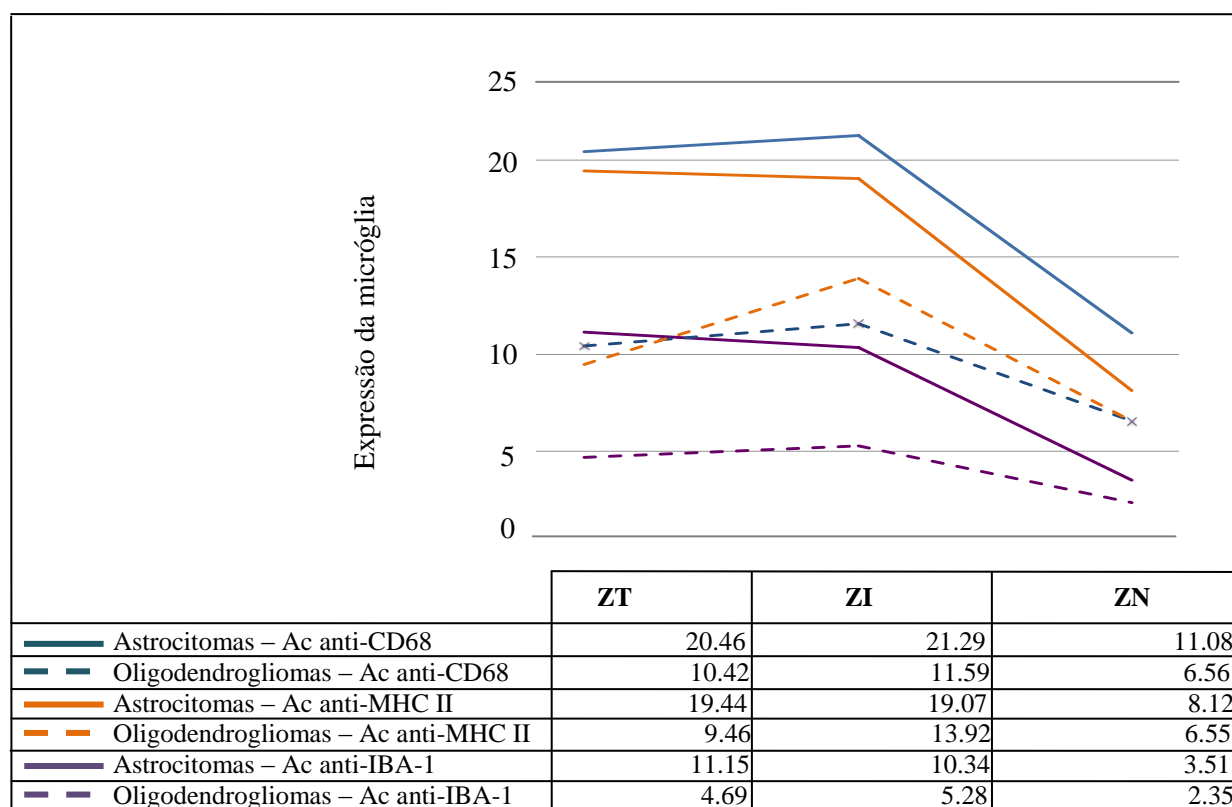
Subdividindo os três tipos de gliomas, observou-se que: nos astrocitomas, independentemente do Ac utilizado, a expressão de micróglia foi significativamente superior ($p = 0.000$), quando comparada com os controlos tumorais; nos oligodendrogliomas, apesar de continuar a existir uma maior expressão de micróglia na ZT comparativamente à dos controlos tumorais, essa variação não foi estatisticamente significativa, para nenhum dos Ac (Ac anti-CD68: $p = 0.679$; Ac anti-MHC II: $p = 0.810$; Ac anti-IBA-1: $p = 0.494$). Nos ependimomas, a expressão da micróglia com o Ac anti-CD68, quando comparada com a dos astrocitomas, oligodendrogliomas e controlos tumorais, foi sempre inferior e estatisticamente significativa [5.26% e 20.46% ($p = 0.000$), 5.26% e 10.42% ($p = 0.023$), 5.26% e 9.43% ($p = 0.035$), respectivamente]. Para o Ac anti-MHC II, a expressão de micróglia continuou a ser menor nos ependimomas relativamente à de todos os outros grupos, embora apenas estatisticamente significativa em relação à dos astrocitomas (8.78% e 19.44%, $p = 0.001$). Finalmente, com o Ac anti-IBA-1, a expressão da micróglia nos ependimomas foi inferior à dos outros tipos de gliomas, mas superior à dos controlos tumorais, embora sem significância estatística ($p = 0.446$).

2.3. Astrocitomas vs. Oligodendrogliomas

Comparando a expressão da micróglia entre os astrocitomas e os oligodendrogliomas, verificou-se que existiram diferenças relevantes entre estes dois tipos de gliomas. Independentemente do Ac, os astrocitomas apresentaram sempre uma maior percentagem de células de micróglia marcadas. No Gráfico 5 apresentam-se as expressões quantitativas dos três Ac da micróglia nos astrocitomas e nos oligodendrogliomas, nas três zonas seleccionadas para o estudo.

Apesar da percentagem de expressão da micróglia ser distinta entre os astrocitomas e os oligodendrogliomas, apenas na ZT se observaram diferenças com relevância estatística: para a marcação com o Ac anti-CD68, a expressão da micróglia nos astrocitomas foi de 20.46%, enquanto nos oligodendrogliomas foi de 10.42% ($p = 0.001$); para a marcação com o Ac anti-MHC II, 19.44% das células dos astrocitomas corresponderam à micróglia, a contrastar com 9.46% nos oligodendrogliomas ($p = 0.002$); para a marcação com o Ac anti-IBA-1, a expressão da micróglia nos astrocitomas foi de 11.15% enquanto nos oligodendrogliomas foi de 4.69% ($p = 0.012$).

Gráfico 5. Comparação da expressão da micróglia entre os astrocitomas e os oligodendrogliomas nas diferentes zonas e para os três Ac utilizados.



+ As linhas a cheio correspondem aos astrocitomas e as tracejadas aos oligodendrogliomas. A cor azul corresponde ao Ac anti-CD68, a laranja ao Ac anti-MHC II e a roxa ao Ac anti-IBA-1. * **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – *Cluster of Differentiation*68; **IBA-1** – *Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1*; **MHC II** – *Major Histocompatibility Complex - class II*; **ZI** – Zona de Invasão; **ZN** – Zona Normal; **ZT** – Zona Tumoral.

Na Figura 21 mostra-se a expressão quantitativa da microglia numa ZN de um caso de astrocitoma difuso (A, B e C) e de um caso de cirurgia de epilepsia (D, E e F), e ainda numa ZT de um endimomas anaplásico (G, H e I) e numa metástase (J, L e M).

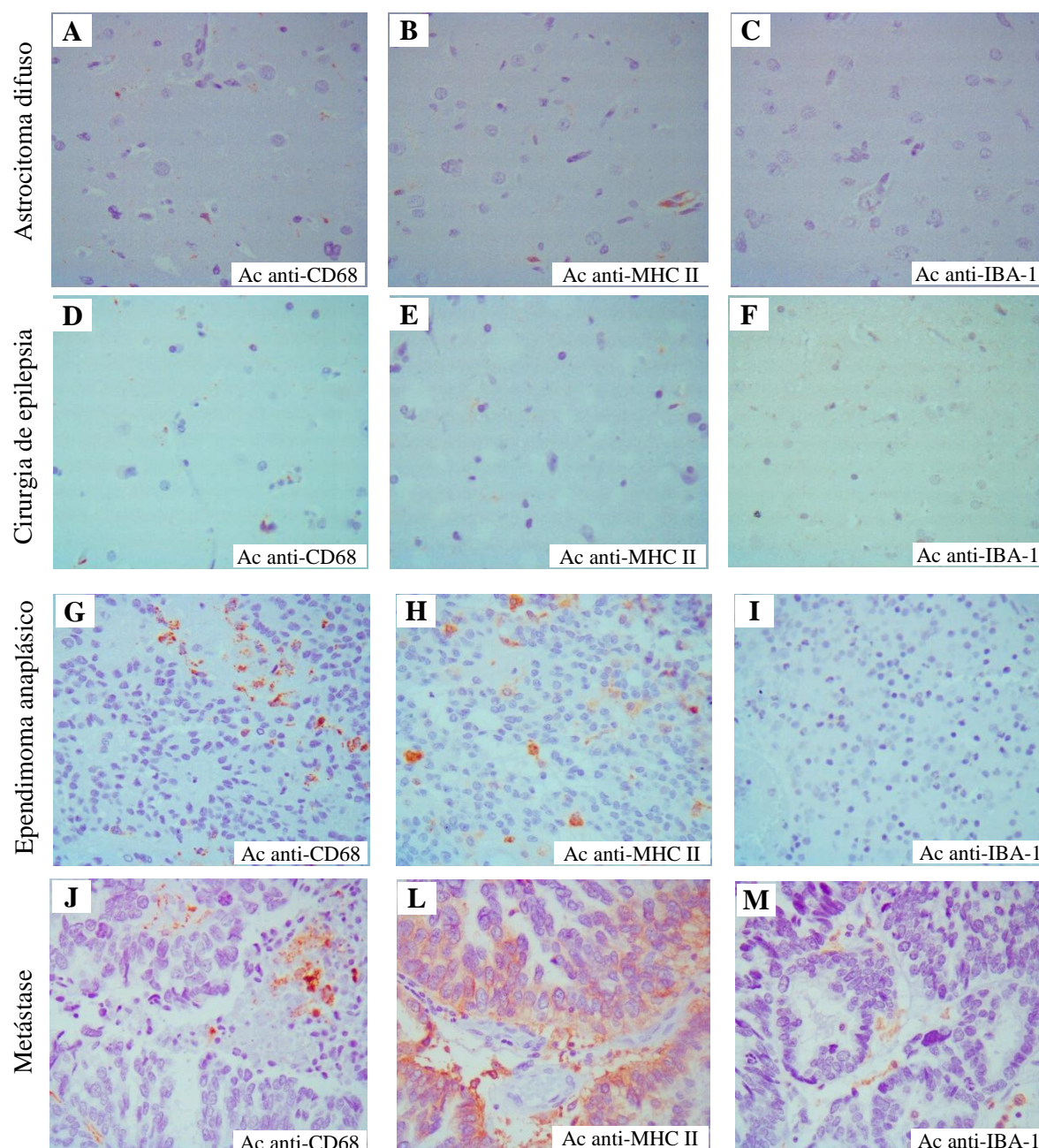


Figura 21. Fotografias da expressão da microglia com as três marcações imunohistoquímicas entre a ZN de um astrocitoma difuso (A, B e C) e de cirurgia de epilepsia (D, E e F), e entre a ZT de um endimoma anaplásico (G, H e I) e de uma metástase (J, L e M). Ampliação de 400x.* **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – *Cluster of Differentiation 68*; **IBA-1** - *Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1*; **MHC II** - *Major Histocompatibility Complex -class II*; **ZN** – Zona Normal; **ZT** – Zona Tumoral.

3. Comparação entre as marcações imunohistoquímicas

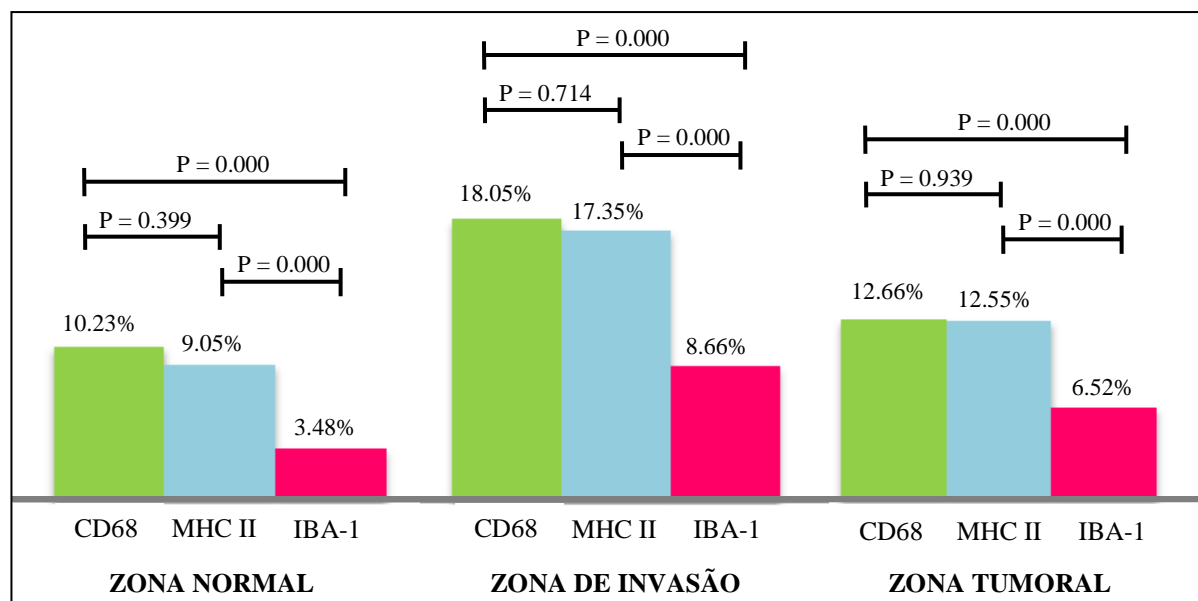
Com o objectivo de seleccionar o Ac mais específico para a identificação da micróglia nos tumores em estudo, compararam-se os resultados obtidos para cada um deles (anti-CD68, anti-MHC II e anti-IBA-1) e para cada um das zonas consideradas.

Para a avaliação da marcação imunohistoquímica na ZN, consideraram-se os astrocitomas, os oligodendrogliomas e os casos de cirurgia de epilepsia ($n = 75$), tendo-se verificado que a expressão da micróglia pelo Ac anti-CD68 foi de 10.23%, pelo Ac anti-MHC II de 9.05% e pelo Ac anti-IBA-1 de 3.48% das células totais. O Ac anti-IBA-1 foi o único que apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos outros Ac ($p = 0.000$).

Esta tendência manteve-se nas outras zonas. Na ZI, para a qual foram considerados os astrocitomas e os oligodendrogliomas ($n = 60$), obteve-se uma marcação de 8.66% com o Ac anti-IBA-1, bastante inferior às marcações com os Ac anti-MHC II e anti-CD68, que corresponderam a 17.35% e 18.05%, respectivamente. Esta diferença também apresentou relevância estatística ($p = 0.000$). Para a ZT, foram incluídos os tumores gliais e os controlos tumorais ($n = 117$), verificando-se que as marcações com os Ac anti-CD68 e anti-MHC II foram idênticas, 12.66% e 12.55%, respectivamente, enquanto com o Ac anti-IBA-1 foi significativamente inferior, 6.52% ($p = 0.000$) (Gráfico 6).

Um exemplo das diferentes expressões quantitativas dos Ac para a micróglia de um caso de oligodendroglioma de baixo grau em estudo é apresentado na Figura 22.

Gráfico 6. Expressão dos três Ac para a microglia em cada uma das zonas da amostra em estudo e de controle.



* **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – *Cluster of Differentiation68*; **MHC II** - *Major Histocompatibility Complex - class II*; **IBA-1** - *Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1*.

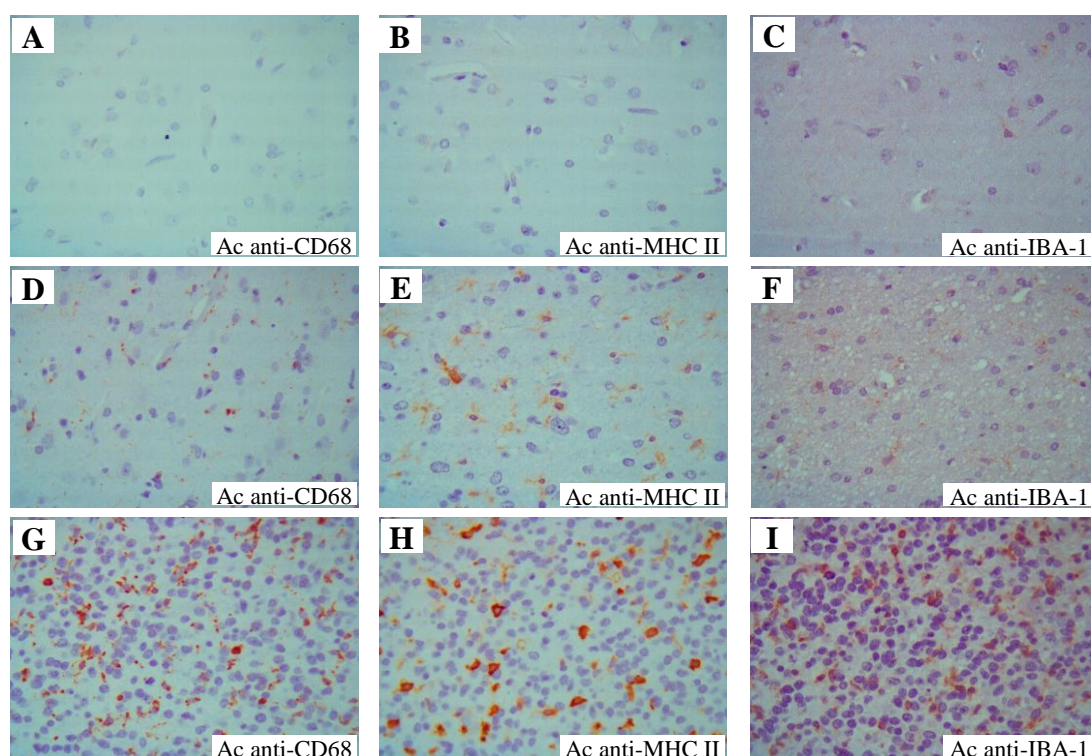


Figura 23. Fotografias da expressão da microglia nas três zonas consideradas. ZN (A, B e C), ZI (D, E e F) e ZT (G, H e I), de um caso de oligodendroglioma de baixo grau e comparação dos três Ac: anti-CD68 (A, D e G); anti-MHC II (B, E e H) e anti-IBA-1 (C, F e I). * **Ac** – Anticorpo/s; **CD68** – *Cluster of Differentiation68*; **IBA-1** - *Ionized calcium-Binding Adapter molecule-1*; **MHC II** - *Major Histocompatibility Complex - class II*; **ZI** – Zona de Invasão; **ZN** – Zona Normal; **ZT** – Zona Tumoral.

V. Discussão

Tal como descrito anteriormente, a micróglia compõe a população de células imunitárias do SNC actuando na sua defesa imunológica e manutenção homeostática³³. Detecta os principais sinais da “invasão patogénica” e tem a função de controlar as lesões no SNC, estando presente, portanto, na maioria das patologias, mas numa forma distinta e com processos de activação e acção diferentes^{33,56}.

Os tumores cerebrais, mais especificamente os gliomas, são um exemplo da sua presença, constituindo um elemento constante do seu “microambiente tumoral”^{13,63}, conjuntamente com outras células imunitárias, como as células dendríticas, os plasmócitos, os linfócitos NK, os linfócitos T e os macrófagos⁶³.

No entanto, o papel exacto da micróglia nesse “microambiente tumoral” não está totalmente esclarecido. No caso dos gliomas, são vários os estudos que a apontam como um elemento activo no processo de invasão e potenciação tumorais^{15,66,67}. Por um lado, explica-se esse papel “potenciador” do crescimento tumoral por parte da micróglia devido à libertação de citocinas e factores neurotróficos, para os quais as células tumorais possuem receptores, levando ao crescimento do tumor. Para além disso, as “células iniciadoras do tumor” demonstram uma capacidade, ao mesmo tempo inibitória da imunidade adaptativa e moduladora da imunidade inata nos GBM, através da activação supressora da MG/MC. Estas últimas, em vez de fagocitarem as células tumorais, irão antes, indirectamente, favorecer o crescimento tumoral, devido à sua imunossupressão no “microambiente tumoral”⁹⁰. Por outro, devido às funções imunitárias e inflamatórias da micróglia, vários autores assumem-na

como possível “supressora” do crescimento tumoral, considerando-a a defesa primordial contra a progressão do tumor^{28,54,63}.

O estudo da micróglia nos tumores gliais tem suscitado interesse dado serem extremamente agressivos devido, em grande parte, à sua capacidade invasiva. Apesar de ser conhecida uma grande variedade de moléculas mediadoras da invasão tumoral (citocinas, factores de crescimento, MMP), estas ainda não se revelaram alvos terapeuticamente relevantes^{53,93}. Sendo a micróglia um dos elementos presentes no “microambiente tumoral”¹⁰⁷, é lícito teorizar acerca da sua importância no desenvolvimento do processo terapêutico. No entanto, o seu eventual papel no processo de invasão ainda é pouco conhecido¹⁰⁹.

Neste sentido, foi objectivo principal desta investigação aprofundar a caracterização da distribuição da micróglia nos tumores gliais, procurando verificar alterações na sua expressão em diferentes zonas de uma amostra representativa de gliomas com diversos graus de anaplasia.

Estudos anteriores da micróglia nos gliomas focaram-se maioritariamente na ZT⁶. Por exemplo, Morris *et al* e Roggendorf *et al* estudaram a sua presença nessa zona e na “zona limítrofe” do tumor, mas com um número reduzido de casos e sem compararem quantitativamente as duas áreas consideradas^{71,92}. Estes escassos trabalhos, utilizando marcações imunohistoquímicas, focaram-se maioritariamente em tumores da linha astrocitária, ficando a análise da micróglia subestudada em tumores oligodendrogliais e ependimários. O presente estudo torna-se importante na medida em que a avaliação da micróglia foi realizada em três tipos de tumores gliais incluindo uma amostra bastante representativa de ependimomas, sendo a primeira vez que este tópico é estudado com uma amostra tão completa. O número máximo de casos analisados em estudos anteriores foi de 5

ependimomas de baixo grau e 4 anaplásicos, por Roggendorf *et al*, em 1996 ⁹². Alargou-se ainda a amostra total dos gliomas, incluindo os quatro graus de anaplasia dos astrocitomas e os dois dos oligodendrogliomas, todos nas três zonas consideradas importantes.

Badie *et al* admitiram que a micróglia deverá ocupar cerca de 13% a 34% do “microambiente tumoral” ³ e Morimura *et al* assumiram que ocuparia entre 20 a 30% ⁷⁰ do total das células. No entanto, outros autores chegaram a referi-la como a população predominante. Por exemplo, em GBM, a percentagem de células de MG/MC seria, em média, de 43% (entre 8% e 78%) ⁶³ e de cerca de 50% em astrocitomas gemistocíticos³⁰.

No presente trabalho, a percentagem de micróglia presente na ZT variou entre 3.25% (oligodendrogliomas anaplásicos com o Ac anti-IBA-1) e 28.80% (astrocitomas pilocíticos com o Ac anti-MHC II). Considerando a expressão da micróglia no conjunto dos tumores gliais, esta variou entre 7.91% e 14.28%, consoante o Ac utilizado.

Analisando individualmente cada tipo de tumor glial, os astrocitomas apresentaram sempre a maior expressão de micróglia nas três marcações imunohistoquímicas, os ependimomas a menor e os oligodendrogliomas expressões intermédias. A diferença entre os astrocitomas e os restantes tumores gliais foi estatisticamente significativa.

De igual modo, a comparação da expressão de micróglia na ZN e ZI entre o conjunto dos astrocitomas e dos oligodendrogliomas mostrou que os primeiros tiveram sempre uma maior percentagem, não significativa porém, de células marcadas nestas duas zonas, independentemente do Ac utilizado.

Uma possível razão para a expressão da micróglia ser superior num determinado tipo de glioma prende-se com a respectiva origem celular. Sabe-se que os astrocitomas são

derivados dos astrócitos, ou dos seus precursores⁴, os quais, em condições normais, estabelecem uma relação muito íntima com a micróglia¹⁰⁷.

De facto, os astrócitos estão envolvidos na activação da micróglia, ao mesmo tempo que a micróglia também actua na activação astrocitária¹⁰⁷. Estes dois elementos têm um papel conjunto na defesa do SNC^{4,63}, nomeadamente em patologias como as DA, DP, ELA e EM^{4,95}. Nestas situações, os astrócitos tornam-se reactivos (processo denominado astrogliose reactiva⁶³) e libertam mediadores imunitários, como sejam citocinas, quimiocinas e factores de crescimento, que podem exercer efeitos neuroprotectores ou neurotóxicos, havendo um complexo balanço entre a pró-inflamação e a anti-inflamação astrocitária⁴. Quando ocorre a activação M1 da micróglia, esta interage com os astrócitos os quais produzirão mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela activação e proliferação constantes da micróglia⁹⁵.

Esta pode ser uma das justificações para os resultados obtidos nesta investigação. Na realidade, a já referida constatação de uma maior expressão de micróglia em astrocitomas do que em qualquer outro tipo de tumor glial, poderá estar associada à interacção normalmente existente entre estes dois tipos celulares, facto descrito com menor frequência em relação aos oligodendrócitos e às células endoteliais. A corroborar esta hipótese, O'Brien *et al* constataram que os astrócitos associados a gliomas secretariam CCL2, uma quimiocina recrutadora de macrófagos e de linfócitos. Porém, este recrutamento, apesar de induzir a presença de um maior número de células imunitárias, não resultava na redução do volume destes tumores⁷⁶.

Neste trabalho analisou-se também a expressão de micróglia nas ZN e ZI de cada amostra, comparando-as entre si na tentativa de compreender as interacções da micróglia nas zonas envolventes do tumor. Numa primeira análise, e excluindo os ependimomas por falta de

ZN e ZI nas amostras, verificou-se que os tumores gliais apresentaram uma expressão significativamente menor de micróglia na ZN nas três marcações imunohistoquímicas, em relação às ZI e ZT. Entre a ZI e a ZT essa diferença não teve significância estatística.

Estes resultados estão de acordo com o estudo de Roggendorf *et al* que refere, em 8 casos de autópsia, esta expressão aumentada na periferia e no centro tumoral, comparativamente às áreas não neoplásicas do hemisfério contralateral e no parênquima de cérebros sem qualquer lesão neurológica⁹². No entanto, estes autores não analisaram ZN envolventes dos gliomas malignos estudados, tão pouco compararam a expressão da micróglia entre ZI e ZT.

Contudo, é importante avaliar a expressão da micróglia na ZN adjacente ao tumor, e não apenas em amostras de controlos normais ou zonas contralaterais do mesmo paciente, pelo facto de só desta maneira ser possível compreender o tipo de resposta microglial naquela região.

Este trabalho, para além de estudar a ZN envolvente do tumor, incluiu também controlos normais com o objectivo de verificar eventuais expressões diferentes da micróglia entre esta zona e o parênquima normal dos controlos, em resultado da presença de um tumor. De acordo com os resultados obtidos, e com o recurso aos Ac anti-CD68 e anti-IBA-1, a percentagem de células da micróglia na ZN dos gliomas não foi significativamente diferente da expressão dos controlos normais.

Normalmente, a micróglia apresenta-se amplamente distribuída por todo o SNC³³. Na presença de um distúrbio ou perda de homeostasia cerebral indicadora de potencial lesão para o SNC, como sejam os gliomas, esta torna-se móvel e adquire capacidade proliferativa.

Nestas condições, deslocar-se-á para a área da lesão, seguindo os gradientes quimotáticos, e proliferará de forma a providenciar o maior número de células para uma defesa adequada^{56,63}.

De acordo com os resultados agora obtidos, e tendo em conta que não se verificaram alterações na expressão da micróglia entre a ZN dos gliomas e os controlos normais, pressupõe-se que o aumento da percentagem da micróglia nas ZI e ZT será devido, maioritariamente, à proliferação local dessas células.

Para além de se terem analisado alterações da expressão da micróglia, não só entre tipos de tumores gliais, mas também quando comparadas com controlos normais, procurou-se também identificar padrões desta expressão dentro do mesmo tipo de tumor, em função do grau de anaplasia. Nesse sentido, consideraram-se as expressões da micróglia, com os três Ac utilizados em cada uma das zonas, subdividindo os astrocitomas em baixo (astrocitomas pilocíticos e astrocitomas difusos) e alto grau (astrocitomas anaplásicos e GBM). Esta categorização, e não a subdivisão nos quatro graus de anaplasia, foi realizada por não se terem verificado diferenças suficientemente relevantes entre os quatro graus isoladamente. Apenas se identificaram padrões distintos entre os astrocitomas pilocíticos e astrocitomas difusos *versus* astrocitomas anaplásicos e GBM.

Nos astrocitomas de baixo grau o padrão de expressão da micróglia, nas três marcações imunohistoquímicas, foi menor na ZN, seguida da ZI e da ZT. No caso dos de alto grau, foi menor na ZN, seguida da ZT e da ZI.

É de referir que as expressões da micróglia nas ZN e ZI destes dois grupos de astrocitomas foram equivalentes. No entanto, para a ZT, e nos três Ac utilizados, foi significativamente superior nos astrocitomas de baixo grau, demonstrando haver um padrão diferencial da expressão da micróglia consoante o grau de anaplasia dos astrocitomas,

eventualmente relacionado com um efeito distinto das células tumorais na imunossupressão *versus* proliferação da micróglia.

A imunossupressão tumoral constitui um mecanismo conhecido na regulação do crescimento dos tumores gliais. Os elementos gliais neoplásicos inibem a actividade das células imunitárias do organismo, como a micróglia, através da produção de IL (IL-4, IL-6 e IL-10), de PGE2 e de TGF- β ^{63,95}.

Alguns estudos têm comparado a expressão de IL nos diferentes tipos de tumores gliais. No de Huettnner *et al*, foi observado que a produção de IL-10, em particular, parece ser dependente do grau de anaplasia do tumor, uma vez que nos astrocitomas de alto grau a produção do mRNA de IL-10 foi significativamente superior à encontrada nos de baixo grau⁴⁷. É sugerido que os gliomas com elevada capacidade invasiva, face ao aumento da mobilidade dos seus elementos, expressam mais IL-10 do que os mais localizados, levando à imunossupressão das células imunitárias e consequente progressão tumoral⁴⁷.

Por exemplo, Sasaki *et al* detectaram a IL-6, ao nível do transcrito, em cinco de um total de nove GBM, mas pouca ou nenhuma em astrocitomas de baixo grau, oligodendrogliomas e ependimomas. Ao nível proteico, esta expressão foi localizada nas células tumorais e nos macrófagos em quatro de sete GBM. Os autores propuseram que esta IL estaria envolvida exclusivamente na progressão dos GBM⁹⁶.

O que aconteceria nesta situação seria algo semelhante ao que alguns autores descrevem em casos de neuroinflamação, em que os astrócitos são responsáveis por atenuar a activação excessiva da micróglia, devido à produção de PGE2 e de TGF- β ^{94,103}, o que leva à imunossupressão destas células.

Outros estudos têm apresentado evidências sobre a acção imunossupressiva das células tumorais sobre a micróglia. Voison et al (2010), através de co-culturas de células de GBM e de micróglia, procederam ao estudo de algumas alterações morfológicas e funcionais da micróglia em resposta à presença de células tumorais. As principais conclusões foram que, numa fase inicial de contacto com o tumor, a micróglia desempenha as suas funções normais de célula fagocitária mas, com o avançar do tempo, esta interacção acaba por causar a diminuição gradual da sua capacidade fagocitária, o que também aparece relacionado com a libertação de diferentes moléculas, como citocinas e factores de crescimento. Pressupõem, então, que possa existir uma acção destes factores presentes no “microambiente tumoral” sobre o metabolismo microglial, diminuindo a capacidade destas células em desempenhar a sua acção pró-inflamatória¹⁰⁵.

No presente estudo procurou-se também encontrar alterações do padrão da expressão da micróglia nos oligodendrogliomas em função do seu grau de anaplasia, não tendo, no entanto, sido possível estabelecê-lo devido à variabilidade dos resultados obtidos.

Através dos trabalhos descritos anteriormente, adquire-se a noção de que existem moléculas envolvidas na invasão e agressividade tumorais que são mais expressas em astrocitomas do que em oligodendrogliomas e ependimomas^{98,99}, facto que pode também ser justificativo da menor expressão da micróglia nestes dois últimos tipos de tumores gliais, tal como verificado na presente investigação.

Devido às suas características topográficas, apenas se estudou a expressão da micróglia na ZT dos ependimomas, a qual apresentou uma expressão inferior à das ZT dos outros tumores gliais. Fazendo uma análise geral dos resultados constatou-se que este tipo de glioma apresentou a menor expressão da micróglia, comparativamente a qualquer outro caso

ou controlo (Tabela 11). Após se terem realizado as comparações a que este trabalho se propôs, e face às diferenças encontradas entre os ependimomas e os outros grupos, achou-se relevante comparar a expressão da micróglia entre a ZT dos ependimomas e a ZN dos controlos normais. Para os Ac anti-MHC II e anti-IBA-1 verificou-se que a percentagem de micróglia na ZT dos ependimomas não foi estatisticamente diferente da sua expressão na ZN dos restantes tumores gliais (Ac anti-MHC II: $p = 0.392$; Ac anti-IBA-1: $p = 0.905$) e dos controlos (Ac anti-MHC II: $p = 0.992$; Ac anti-IBA-1: $p = 0.481$). Este facto poderá significar que a resposta microglial à presença de um ependimoma não difere substancialmente de situações em que não existe qualquer tipo de tumor glial.

Procurou-se também comparar a distribuição da micróglia entre os tumores gliais e outros tumores do SNC, de forma a perceber se a sua resposta seria semelhante independentemente do tipo de tumor, ou se apresentaria alguma especificidade para actuar nos primeiros. Nesse sentido, foram utilizadas as metástases de adenocarcinoma da mama e do pulmão, os meduloblastomas e os hemangioblastomas. A razão desta diferente natureza dos controlos tumorais assentou na tentativa de se utilizar uma amostra o mais heterogénea possível, tornando-a mais representativa.

Os resultados obtidos demonstraram que a expressão da micróglia para todos os Ac foi significativamente superior nos tumores gliais em comparação com os não gliais, achados que foram ao encontro dos de Griesinger *et al*, nos quais se registou maior expressão de células imunitárias (MHC II e CD34) nos astrocitomas pilocíticos e nos ependimomas do que nos meduloblastomas⁴⁰.

A primeira interpretação passível de ser feita seria a micróglia ter uma resposta mais específica para os tumores gliais comparativamente aos outros tumores, dado provirem do

mesmo grupo de células (glia). No entanto, constatou-se que os astrocitomas apresentam um significativo aumento de expressão de micróglia comparativamente aos outros gliomas e aos controlos tumorais.

Face ao exposto anteriormente, acerca da interacção entre os astrócitos e as células da micróglia^{4,63,108}, parece possível admitir uma resposta desta mais direccionada para os astrocitomas, e não genericamente para os tumores gliais. Daí que, quando se compara a expressão da micróglia entre os gliomas e os controlos tumorais, se verifique uma expressão aumentada nos tumores gliais, devido, provavelmente, aos astrocitomas.

Neste estudo, não foram analisados tumores neuronais. Roggendorf *et al*, demonstraram uma escassa expressão de MG/MC em tumores neuronais benignos, como seja o neurocitoma e o gangliocitoma sem, no entanto, a comparar com a dos tumores gliais, também analisados⁹². Contudo, tal comparação poderá constituir uma interessante linha de investigação, de forma a tentar perceber se a micróglia terá, como atrás proposto, uma resposta mais direccionada para os tumores da linha glial e não para outros derivados de uma mesma célula progenitora – célula neuroepitelial.

O último objectivo do presente trabalho prendeu-se com a tentativa de definir os Ac mais úteis para a identificação imunohistoquímica da micróglia nos tumores gliais. Na verdade, apesar de serem muitos os utilizados na identificação da micróglia, estes identificam, também, outros elementos celulares, como sejam os macrófagos periféricos e residentes do SNC. Por norma, os estudos associados à micróglia não a diferenciam dos restantes. Excluindo o trabalho de Roggendorf *et al*⁹², são praticamente inexistentes os que tiveram como objectivo a distinção destes elementos, a par de outros que, mesmo admitindo como objectivo o estudo da MG/MC, acabam por falar, especificamente, da micróglia¹⁰⁹.

Fazendo uma análise global de toda a amostra (casos e controlos) na ZN, a marcação superior foi a do Ac anti-CD68, seguida da do anti-MHC II e da do Ac anti-IBA-1. Na ZI, o padrão foi semelhante. Na ZT, o Ac anti-MHC II e o anti-CD68 apresentaram expressões idênticas e superiores ao Ac anti-IBA-1.

Independentemente da zona analisada, o Ac anti-IBA-1 foi o único que apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos outros dois. Na realidade, as expressões imunohistoquímicas de Ac anti-MHC II e anti-CD68 foram muito superiores às do anti-IBA-1, facto que pode ser devido a diferentes especificidades dos Ac.

Analisando a literatura, verifica-se que o MHC II, para além da micróglia, é expresso noutras células, como os linfócitos B¹ e os macrófagos (residentes e periféricos)⁹⁰. Por outro lado, alguns autores descreveram os astrócitos como APC facultativas residentes no SNC¹⁷ e como células que expressam MHC II^{21,63}. Assim sendo, todos estes elementos poderão ter sido marcados pelo Ac anti-MHC II, conjuntamente com a micróglia, aumentando, desta forma, a sua expressão imunohistoquímica e, indirectamente, a quantificação feita. Este facto poderá ter enviesado a percentagem real da expressão imunohistoquímica da micróglia neste estudo.

Situação idêntica terá ocorrido com o Ac anti-CD68. Este é referido como selectivo para células da linha hematopoiética mielóide, como sejam os macrófagos e a micróglia⁴⁵. No entanto, Gottfried *et al* demonstraram a sua marcação em células não pertencentes a essa linha, tais como em linfócitos e fibroblastos, bem como em células endoteliais e em algumas linhas de células tumorais³⁵.

No caso do Ac anti-IBA-1, tendo em conta os resultados obtidos na análise da amostra total, verificou-se que apresentou, na grande maioria, uma marcação significativamente

inferior em relação à dos outros dois marcadores. Esta evidência poderá supor que este Ac apresenta menor expressão noutras células e, assim, ser mais representativo da micróglia.

No entanto, os resultados obtidos e a técnica utilizada não permitem afirmar que a marcação com o Ac anti-IBA-1, apesar de ter sido inferior, é exclusivamente da micróglia. Recorrendo a estudos imunohistoquímicos, torna-se difícil assegurar que as células marcadas sejam exclusivamente da micróglia, sem qualquer participação dos macrófagos, uma vez que, no estado activado, esta adquire uma morfologia semelhante à dos macrófagos. Como tal, tornar-se-á mais correcto designar a população marcada de MG/MC.

Contudo, e apesar de terem ocorrido diferenças entre as marcações dos Ac, é de ressalvar que as conclusões obtidas ao longo desta investigação são independentes desse facto, uma vez que os resultados são consistentes com os três Ac.

Para identificar exclusivamente a percentagem de células da micróglia expressa em tumores gliais, poderia proceder-se, por exemplo, à técnica de citometria de fluxo, a qual permitiria isolar a micróglia dos macrófagos, com base no fenótipo CD45 e CD11b⁸². No entanto, grande parte da informação adquirida resultante desta investigação imunohistoquímica seria posta em causa uma vez que, nomeadamente, não seria possível verificar a distribuição da micróglia nas várias zonas envolventes do tumor, um dos principais objectivos da mesma.

Um dos objectivos do trabalho era também avaliar a distribuição da micróglia em relação aos constituintes normais do “microambiente tumoral” (vasos, neurónios e células da glia), o que não foi concretizado. Nem sempre foi possível identificar esses constituintes com segurança, pela coloração de rotina utilizada (H&E), bem como pelos marcadores imunohistoquímicos utilizados. Por outro lado, houve casos em que esses elementos não se

observaram de todo, tendo em conta o tipo de parênquima cerebral e, em muitos casos, as pequenas dimensões de algumas amostras.

Não foi objectivo deste trabalho responder a uma das perguntas mais frequentes quando se estuda a acção da micróglia nos gliomas e que diz respeito ao seu eventual papel “potenciador” ou “inibidor” da proliferação tumoral.

Na realidade, qualquer alusão a este assunto, com base na investigação desenhada (estudo exclusivamente imunohistoquímico) poderia apenas advir da confrontação dos resultados obtidos com o comportamento biológico pós-cirúrgico do tumor. Desta maneira, sim, talvez fosse possível correlacionar certos padrões de proliferação microglial com esse comportamento e, deste modo, perceber, mesmo que indirectamente, o papel da micróglia nesse particular. Porém, o estudo não foi desenhado neste sentido, devido à dificuldade existente na colecção de dados clínicos dos doentes no período pós-operatório.

Em todo o caso, face aos resultados obtidos, mais especificamente no estudo dos astrocitomas, a MG/MC parece apresentar uma função protectora contra o crescimento tumoral. Nos astrocitomas de baixo grau, esta população prolifera nas ZI e ZT, enquanto nos de alto grau, apesar de continuar a haver proliferação na ZI, verifica-se uma diminuição da mesma na ZT. Uma das razões para este facto pode assentar na constatação de que em tumores menos agressivos, a micróglia consegue “combater” as células tumorais, desempenhando a sua função imunitária mas que, face a tumores de graus superiores de anaplasia, será imunossuprimida pelas células tumorais, deixando de proliferar.

Ainda com base nestes mesmos resultados, a micróglia não parece fazer parte das células neoplásicas, como a teoria de fusogenicidade assume⁴⁸. Na realidade, se se admitisse que a micróglia é um componente tumoral, esta deveria estar aumentada, particularmente nos

astrocitomas de alto grau, o que não se verificou neste estudo, onde ocorreu uma diminuição da percentagem da micróglia em astrocitomas de alto grau, comparativamente aos de baixo grau. Assim sendo, parece mais provável que a micróglia esteja presente no “microambiente tumoral” como um elemento celular isolado não neoplásico.

Torna-se difícil nesta investigação comprovar o possível papel “potenciador” da micróglia no crescimento tumoral, uma vez que, caso desempenhasse tal função, seria de esperar que a sua expressão se mantivesse e, em conjunto com o tumor, colaborasse para a sua progressão. Ao invés, o que parece acontecer é uma acção inibitória das células tumorais em relação à proliferação da micróglia, como se o tumor tentasse anular a sua função imunitária.

VI. Conclusão e perspectivas futuras

Tendo em conta os resultados obtidos e a sua discussão, poder-se-á apresentar como principais conclusões deste trabalho as seguintes:

- A expressão da MG/MC está aumentada nos tumores gliais em comparação com os controlos tumorais utilizados;
- Os astrocitomas são os gliomas que apresentam maior expressão da MG/MC, enquanto os endimomas são os que a expressam menos;
- A MG/MC apresenta uma expressão diferencial em função do grau de anaplasia dos astrocitomas: a percentagem de células marcadas na ZT dos astrocitomas de alto grau é significativamente menor do que na ZT dos de baixo grau, possivelmente devido à imunossupressão tumoral;
- A ZN dos tumores gliais é a que apresenta menor expressão de MG/MC, quando comparada com as restantes zonas em estudo (ZI e ZT);
- Os resultados obtidos foram similares para os três Ac utilizados, apesar de a marcação com o Ac anti-IBA-1 ser inferior às restantes.

Este trabalho contribuiu, assim, para melhor compreender o papel da micróglia nestes tipos de tumores, bem como a interacção glioma-micróglia, ao estudar aprofundadamente o “microambiente tumoral”. Tendo estas conclusões como base, seria interessante continuar a caracterização da micróglia nestes tumores, de forma a aumentar o conhecimento nesta área.

Inicialmente, os oligoastrocitomas foram excluídos deste estudo pelo facto de se pretender estudar, exclusivamente, tumores derivados de apenas uma linhagem celular. Face às diferenças da expressão da micróglia entre astrocitomas e oligodendrogliomas, seria

interessante reproduzir este trabalho em oligoastrocitomas, que apresentam características histológicas comuns a esses dois tumor^{64,78}. Da mesma maneira, a caracterização da distribuição da micróglia em tumores da linha neuronal, como os neurocitomas, seria uma forma de perceber se a sua acção poderá ser possivelmente mais direccionada para a glia.

Não deixando de ser importante a avaliação da distribuição da micróglia em relação aos constituintes normais e neoplásicos do “microambiente tumoral”, esta poderá constituir um trabalho futuro. Neste caso, seria mais fiável, para além da utilização de Ac microgliais, o recurso a um painel de marcadores específicos para cada um destes elementos cerebrais. Em cada amostra seria realizada uma dupla marcação que consistiria na identificação simultânea da micróglia e de cada um desses elementos, permitindo relacionar a sua localização no “microambiente tumoral”.

A questão da micróglia ser “potenciadora” ou “supressora” do crescimento tumoral ainda está por clarificar e, como resultado desta investigação, esta parece sofrer uma imunossupressão no “microambiente tumoral” de tumores gliais de grau mais elevado. Uma forma de perceber quais os mecanismos subjacentes a essa inibição microglial seria a quantificação dos mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios libertados no “microambiente tumoral” para os quais a micróglia terá receptores específicos. Esta quantificação poderia ser feita por análise da expressão do mRNA e da expressão proteica dessas moléculas.

Face à complexidade deste assunto e à importância funcional que apresenta no SNC, a micróglia irá, certamente, continuar a ser alvo de vários estudos. Avaliar a sua distribuição e a função na patologia tumoral poderá ser tão importante para as Neurociências como para a Oncobiologia.

VII. Bibliografia

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillari, S. (2007). *Cellular and Molecular Immunology*, 6th Edition. China: Saunders Elsevier.
2. Allen, N. J., Barres, B. A. (2009 Feb 5). Neuroscience: Glia - more than just a brain glue. *NATURE*, 457(7230), 675-7.
3. Badie, B., Schartner, J. (2001 Jul 15). Role of microglia in glioma biology. *MICROSCOPIC RESEARCH AND TECHNIQUE*, 54(2), 106-13.
4. Bélanger, M., Magistretti, P. J. (2009). The role of astroglia in neuroprotection. *TRANSLATIONAL RESEARCH*, 11(3), 281-95.
5. Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., Roumier, A. (2007 Feb). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *GLIA*, 55(3), 233-8.
6. Bettinger, I., Thanos, S., Paulus, W. (2002 Apr). Microglia promote glioma migration. *ACTA NEUROPATHOLOGY*, 103(4), 351-5.
7. Boche, D., Perry, V. H., Nicoll, J. A. (2013 Feb). Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY*, 39(1), 3-18.
8. Borda, J. T., Alvarez, X., Mohan, M., Hasegawa, A., Bernardino, A., Jean, S., Aye, P., Lackner, A. A. (2008). CD163, a marker of perivascular macrophages, is up-regulated by microglia in simian immunodeficiency virus encephalitis after haptoglobin-hemoglobin complex stimulation and is suggestive of breakdown of the blood-brain barrier. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, 172(3), 725-37.
9. Brada, M., Judson, I., Beale, P., Moore, S., Reidenberg, P., Statkevich, P., Dugan, M., Batra, V., Cutler, D. (1999). Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (sch 52365) for refractory or relapsing malignancies. *BRAIN JOURNAL CANCER*, 81(6), 1022-30.
10. Burkitt, H. G., Young, B., Heath, J. W. (1993). *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*, 3rd Edition. London: Churchill Livingstone.
11. Carson, M. J., Thrash, J. C., Walter, B. (2006 Dec). The cellular response in neuroinflammation: the role of leukocytes, microglia in neuronal death and survival. *CLINICAL NEUROSCIENCE RESEARCH*, 6(5), 237-245.

12. Chan, W. Y., Kohsakab, S., Rezaie, P. (2007 Feb). The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *BRAIN RESEARCH REVIEW*, 53(2), 344-54.
13. Charles, N. A., Holland, E. R., Gilbertson, R., Glass, R., Kettenmann, H. (2012 Mar). The brain tumor microenvironment. *GLIA*, 60(3), 502-14.
14. Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T. (1999). *Robbins Pathology Basis of Disease*, 6th Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier.
15. Dagnakatte, G. C., Gutmann, D. H. (2007 May 1). Neurofibromatosis-1 (Nf1) heterozygous brain microglia elaborate paracrine factors that promote Nf1-deficient astrocyte and glioma growth. *HUMAN MOLECULAR GENETICS*, 16(9), 1098-112.
16. David, S., Kroner, A. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *NATURE*, 12(7), 388-99.
17. De Keyser, J., Laureys, G., Demol, F., Wilczak, N., Mostert, J., Clinckers, R. (2010). Astrocytes as potential targets to suppress inflammatory demyelinating lesions in multiple sclerosis. *NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL*, 57(4), 446-50.
18. Deininger, M. H., Meyermann, R., Schluesener, H. J. (2002 Mar 13). The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS LETTERS*, 514(2-3), 115-21.
19. Deininger, M. H., Seid, K., Engel, S., Meyermann, R., Schluesener, H. J. (2000 Dec). Allograft inflammatory factor-1 defines a distinct subset of infiltrating macrophages/microglial cells in rat and human gliomas. *ACTA NEUROPATHOLOGY*, 100(6), 673-80.
20. Del Bigio, M. R. (2010 Jan). Ependymal cells: biology and pathology. *ACTA NEUROPATHOLOGY*, 119(1), 55-73.
21. Dong, Y., Benveniste, E. N. (2001). Immune function of astrocytes. *GLIA*, 36(2), 180-90.
22. Emdad, L., Dent, P., Sarkar, D., Fisher, P. B. (2012). Future approaches for the therapy of malignant glioma: targeting genes mediating invasion. *FUTURE ONCOLOGY*, 8(4) : 343-6.
23. Eyo, U. B., Dailey, M. E. (2013 Jun). Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. *JOURNAL NEUROIMMUNE PHARMACOLOGY*, 8(3), 494-509.

24. Ferro, J., Pimentel, J. (2006). *Neurologia: Princípios, Diagnóstico e Tratamento*. Lousã: Lidel.
25. Fields, R. D., Burnstock, G. (2006). Purigenic signalling in neuron-glia interactions. *NATURE REVIEWS*, 7, 423-37.
26. Fuller, G. N., Goodman, J. C. (2001). *Practical Review of Neuropathology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
27. Gabelloni, P., Da Pozzo, E., Bendinelli, S., Costa, B., Nuti, E., Casalini, F., Orlandini, E., Da Settimo, F., Rossello, A., Martini, C. (2010 Jun 30). Inhibition of metalloproteinases derived from tumours: new insights in the treatment of human glioblastoma. *NEUROSCIENCE*, 168(2), 514-22.
28. Galarneau, H., Villeneuve, J., Gowing, G., Julien, J. P., Vallieres, L. (2007 Sep 15). Increased glioma growth in mice depleted of macrophages. *CANCER RESEARCH*, 67(18), 8874-81.
29. Garden, G. A., Möller, T. (2006 Jun). Microglia biology in health and disease. *JOURNAL OF NEUROIMMUNE PHARMACOLOGY*, 1(2), 127-37.
30. Geranmayeh, F., Scheithauer, B. W., Spitzer, C., Meyer, F. B., Svensson-Engwall A. C., Graeber, M. B. (2007 Jan). Microglia in gemistocytic astrocytomas. *NEUROSURGERY*, 60(1), 159-66.
31. Gilbert, S. F. (2006). *Developmental Biology*, 8th Edition. USA: Sinauer.
32. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., Merad, M. (2010 Nov 5). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *SCIENCE*, 330(6005), 841-5.
33. Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T. (2013 Apr 17). Origin and differentiation of microglia. *FRONTIERS IN CELLULAR NEUROSCIENCE*, 7:45.
34. Gosh, A., Chaudhuri, S. (2010 Jun 15). Microglial action in glioma: a boon turns bane. *IMMUNOLOGY LETTERS*, 131(1), 3-9.
35. Gottfried, E., Kunz-Schughart, L. A., Weber, A., Rehli, M., Peuker, A., Muller, A., Kastenberger, M., Brockhoff, G., Andreesen, R., Kreutz, M. (2008 May). Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 67(5), 453-63.

36. Graeber, M. B., Scheithauer, B. W., Kreutzberg, G. W. (2002 Nov). Microglia in brain tumors. *GLIA*, 40(2), 252-9.
37. Graeber, M. B., Streit, W. J. (2010 Jan). Microglia: biology and pathology. *ACTA NEUROPATHOLOGY*, 119(1), 89-105.
38. Great Controversies in Neurobiology, Brown University Neur1930E. Acedido a 11 de Fevereiro de 2013 a partir de <https://wiki.brown.edu/confluence/display/BN0193S04/History+of+Glia>.
39. Greter, M., Merad, M. (2013 Jan). Regulation of microglia development and homeostasis. *GLIA*, 61(1), 121-7.
40. Griesinger, A. M., Birks, D. K., Donson, A. M., Amani, V., Hoffman, L. M., Waziri, A., Wang, M., Handler, M. H., Foreman, N. K. (2013). Characterization of distinct immunophenotypes across pediatric brain tumor types. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 191(9), 4880-8.
41. Guedes, A. F. B. D. (2010). *Estudo de marcadores de diagnóstico e prognóstico em gliomas*. Tese de mestrado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
42. Guillemin, G. J., Brew, B. J. (2004 Mar). Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY*, 75(3), 388-97.
43. Hanisch, U. K., Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *NATURE NEUROSCIENCE*, 10(11), 1387-94.
44. Hao, N. B., Lü, M. H., Fan, Y. H., Cao, Y. L., Zhang, Z. R., Yang, S. M. (2012). Macrophages in tumor microenvironment and the progression of tumors. *CLINICAL AND DEVELOPMENTAL IMMUNOLOGY*, 2012, 1-11.
45. Holness, C. L., Simmons, D. L. Molecular cloning of cd68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *BLOOD*, 81(6), 1607-13.
46. Howe, M. L., Barres, B. A. (2012 Jan 31). A novel role for microglia in minimizing excitotoxicity. *BMC BIOLOGY*, 10,7.
47. Huettner, C., Paulus, W., Roggendorf, W. (1995 Feb). Messenger RNA expression of the immunosuppressive cytokine IL-10 in human gliomas. *AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, 146(2): 317-2.

48. Huysentruyt, L. C., Akgoc, Z., Seyfried, T. N. (2011 Sep 22). Hypothesis: are neoplastic macrophages/microglia present in glioblastoma multiforme? *ASN NEURO*, 3(4), pii: e00064.
49. Huysentruyt, L. C., Mukherjee, P., Banerjee, D., Shelton, L. M., Seyfried, T. N. (2008 Jul 1). Metastatic cancer cells with macrophage properties: evidence from a new murine tumor model. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER*, 123(1), 73-84.
50. Huysentruyt, L. C., Seyfried, T. N. (2010 Dec). Perspectives on the mesenchymal origin of metastatic cancer. *CANCER METASTASIS REVIEWS*, 29(4), 695-07.
51. Hwang, S. Y., Yoo, B. C., Jung, J. W., Oh, E. S., Hwang, J. S., Shin, J. A., Kim, S. Y., Cha, S. H., Han, I. O. (2009). Induction of Glioma Apoptosis By Microglia-Secreted Molecules: The Role of Nitric Oxide and Cathepsin B. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, 1793, 1656-68.
52. Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., Fukuuchi, Y. (2001 May). Enhanced expression of iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *STROKE*, 32(5), 1208-15.
53. Jung, J. S., Jung, K., Kim, D. H., Kim, H. S. (2012 Jul). Selective inhibition of MMP-9 gene expression by mangiferin in PMA-stimulated human astrogloma cells: involvement of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *PHARMACOLOGICAL RESEARCH*, 66(1), 95-103.
54. Kanamori, M., Kawaguchi, T., Berger, M. S., Pieper, R. O. (2006 Dec 1). Intracranial microenvironment reveals independent opposing functions of host alphavbeta3 expression on glioma growth and angiogenesis. *THE JOURNAL OF BIOLOGY AND CHEMISTRY*, 281, 37256-64.
55. Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M. (2000). *Principles of Neural Science*, 4th Edition. New York: Mcgraw Hill.
56. Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *PHYSIOLOGY REVIEWS*, 91(2), 461-553
57. Kim, S. Y., Kim, D. H., Han, S. J., Hyun, J. W., Kim, H. S. (2007). Repression of matrix metalloproteinase gene expression by ginsenoside Rh2 in human astrogloma cells. *BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY*, 74(11), 1642-51.
58. Klein, R., Roggendorf, W. (2001 Mar). Increased microglia proliferation separates pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas: a double labeling study. *ACTA NEUROPATHOLOGY*, 101(3), 245-8.

59. Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J., Takeya, M. (2008 Sep). Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *THE JOURNAL OF PATHOLOGY*, 216(1), 15-4.
60. Lee, E. J., Kim, S. Y., Hyun, J. W., Min, S. W., Kim, D. H., Kim, H. S. (2010 Apr 15). Glycitein inhibits glioma cell invasion through down-regulation of MMP-3 and MMP-9 gene expression. *CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS*, 185(1), 18-24.
61. Levin, V. A., Phuphanich, S., Yung, W. K., Forsyth, P. A., Maestro, R. D., Perry, J. R., Fuller, G. N., Baillet, M. (2006 Jun). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of marimastat in glioblastoma multiforme patients following surgery and irradiation. *JOURNAL NEUROLOGY ONCOLOGY*, 78(3), 295-302.
62. Lewis, C. E., Pollard, J. W. (2006 Jan 15). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *CANCER RESEARCH*, 66(2), 605-12.
63. Loriger, M. (2012 Feb 22). Tumor microenvironment in the brain. *CANCERS*, 4(1), 218-43.
64. Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K. (2007). *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, 4th Edition. Lyon: IARC.
65. Luo, X. G., Chen, S. D. (2012 Apr 24). The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *TRANSLATIONAL NEURODEGENERATION*, 1(1), 9.
66. Markovic, D. S., Glass, R., Synowitz, M., van Rooijen, N., Kettenmann, H. (2005 Sep). Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY*, 64(9), 754-62.
67. Markovic, D. S., Vinnakota, K., Chirasani, S., Synowitz, M., Raguet, H., Stock, K., Sliwa, M., Lehmann, S., Kalin, R., van Rooijen, N., Holmbeck, K., Heppner, F. L., Kiwit, J., Matyash, V., Lehnardt, S., Kaminska, B., Glass, R., Kettenmann, H. (2009 Jul 28). Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *PROCEDURES OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE USA*, 106(30), 12530-5.
68. Matsumoto, H., Kumon, Y., Watanabe, H., Ohnishi, T., Shudou, M., Ii, C., Takahashi, H., Imai, Y., Tanaka, J. (2007). Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH*, 85(5), 994-1009.

69. Medicina Geriátrica. Acedido a 10 de Fevereiro de 2013 a partir de <http://www.medicinageriatria.com.br/category/neurogeriatria/page/18/>
70. Morimura, T., Neuchrist, C., Kitz, K., Budka, H., Scheiner, O., Kraft, D., Lassmann, H. (1990). Monocyte subpopulations in human gliomas: expression of fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. *ACTA NEUROPATHOLOGY*, 80(3), 287-94.
71. Morris, S. C., Esiri, M. M. (1991 Jan). Immunocytochemical study of macrophages and microglial cells and extracellular matrix components in human CNS disease. *JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL DISEASE*, 101(1), 47-58.
72. Napoli, I., Neumann, H. (2009 Feb 9). Microglial clearance function in health and disease. *NEUROSCIENCE*, 158(3), 1030-8.
73. Neumann, H., Wekerle, H. (2013 Mar). Brain microglia: watchdogs with pedigree. *NATURE NEUROSCIENCE*, 16(3), 253-5.
74. Nishie, A., Ono, M., Shono, T., Fukushi, J., Otsubo, M., Onoue, H., Ito, Y., Inamura, T., Ikezaki, K., Fukui, M., Iwaki, T., Kuwano, M. (1999 May). Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *CLINICAL CANCER RESEARCH*, 5(5), 1107-3.
75. Novus Biologicals. (2013). CD11b expression, leukocyte adhesion and the innate immune system. Acedido a 14 de Setembro de 2013 a partir de <http://www.novusbio.com/antibody-news/antibodies/cd11b-expression-and-the-innate-immune-system>.
76. O'Brien, E. R., Howarth, C., Sibson, N. R. (2013 Apr 16). The role of astrocytes in CNS tumors: pre-clinical models and novel imaging approaches. *FRONTIERS IN CELLULAR NEUROSCIENCE*, 7, 40.
77. Ohgaki, H., Kleihues, P. (2005 Jan). Epidemiology and etiology of gliomas. *ACTA NEUROPATHOLOGY*, 109(1), 93-108.
78. Ohgaki, H., Kleihues, P. (2011 Jul). Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *BRAIN TUMOR PATHOLOGY*, 28(3), 177-83.
79. Olar, A., Adalpe, K. D. (2012 Dec). Biomarkers classification and therapeutic decision-making for malignant gliomas. *CURRENT TREATMENT OPTIONS IN ONCOLOGY*, 13(4), 417-36.

80. Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N. E., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J. S. (2013 Nov). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *NEURO-ONCOLOGY*, 15,ii1–ii56.
81. Ousman, S. S., Kubes, P. (2012 Aug). Immune surveillance in the central nervous system. *NATURE NEUROSCIENCE*, 15(8), 1096-1101.
82. Parney, I. F., Waldron, J. S., Parsa, A. T. (2009 Mar). Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma– associated macrophages. *JOURNAL OF NEUROSURGERY*, 110(3), 572-82.
83. Perl Brodal. (2004). *The Central Nervous System: Structure and function*, 3rd Edition. Oxford: University Press.
84. Perry, A., Brat, D. J. (2010). *Practical Surgical Neuropathology: a Diagnostic Approach*. London: Churchill Livingstone.
85. Perry, V. H., O'Connor, V. (2010 Oct 14). The role of microglia in synaptic stripping and synaptic degeneration: a revised perspective. *AMERICAN SOCIETY FOR NEUROCHEMISTRY NEURO*, 2(5), e00047.
86. Persson, A., Englund, E. (2009 Sep). The glioma cell edge--winning by engulfing the enemy? *MEDICAL HYPOTHESES*, 73(3), 336-7.
87. Polazzi, E., Monti, B. (2010 Nov). Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *PROGRESS IN NEUROBIOLOGY*, 92(3), 293-315.
88. Pollard, J.W. (2004 Jan). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *NATURE REVIEW CANCER*, 4(1), 71-8.
89. Ponomarev, E. D., Shriver, L. P., Maresz, K., Dittel, B. N. (2005 Aug 1). Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH*, 81(3), 374-89.
90. Ransohoff, R. M., Cardona, A. E. (2010 Nov 11). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *NATURE*, 468(7321), 253-62.
91. Rao, J. S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *NATURE REVIEWS*, 3(7), 489-501.

92. Roggendorf, W, Strupp, S., Paulus, W. (1996 Sep). Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. *ACTA NEUROPATHOLOGY*, 92(3), 288-93.
93. Roy, R., Yang, J., Moses, M. A. (2009 Nov 1). Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, 27(31), 5287-97.
94. Rozenfeld, C., Martinez, R., Figueiredo, R. T., Bozza, M. T., Lima, F. R., Pires, A. L., Silva, P. M., Bonomo, A., Lannes-Vieira, J., De Souza, W., Moura-Neto, V. (2003). Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration. *INFECTION AND IMMUNITY* 71(4), 2047-57.
95. Saijo, K., Glass, C. K. (2011 Oct 25). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *NATURE REVIEWS*, 11(11), 775-87.
96. Sasaki, A., Ishiuchi, S., Kanda, T., Hasegawa, M., Nakazato, Y. (2001). Analysis of interleukin-6 gene expression in primary human gliomas, glioblastoma xenografts, and glioblastoma cell lines. *BRAIN TUMOR PATHOLOGY*, 18(1), 13-21.
97. Scheithanauer, B. W. (2009 Oct). Historical perspective: development of the who classification of tumors of the central nervous system: a historical perspective. *BRAIN PATHOLOGY ISSN*, 19(4), 551-64.
98. Schiederjan, M. J., Brat, D. J. (2011). *Biopsy Interpretation of the Central Nervous System*. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins.
99. Slomianka, L. (2009). School of anatomy and human biology - The University of Western Australia: blue histology - nervous tissue. Acedido a 18 de Fevereiro de 2013 a partir de <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/nervous/nervous.htm#Glia>.
100. Smitha, J. A., Dasa, A., Rayb, S. K., Banik, N. L. (2012 Jan 4). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *BRAIN RESEARCH BULLETIN*, 87(1), 10-20.
101. Sofroniew, M. V., Vinters, H. V. (2010 Jan). Astrocytes: biology and pathology. *ACTA NEUROPATHOLOGY*, 119(1), 7-35.
102. Verkhratsky, A., Butt, A. (2013). *Glial Physiology and Pathophysiology, 1st Edition* . Wiley-Blackwell.
103. Vincent, V. A., Tilders, F. J., Van Dam, A. M. (1997 Mar). Inhibition of endotoxin-

induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta. *GLIA* 19(3), 190-8.

- 104.** Vilhardt, F. (2005 Jan). Microglia: phagocyte and glia cell. *THE INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY*, 37(1), 17-21.
- 105.** Voisin, P., Bouchaud, V., Merle, M., Diolez, P., Duffy, L., Flint, K., Franconi, J. M., Bouzier-Sore, A. K. (2010 Oct 12). Microglia in close vicinity of glioma cells: correlation between phenotype and metabolic alterations. *FRONTIERS IN NEUROENERGETICS*, 2:131.
- 106.** Watters, J. J., Schartner, J. M., Badie, B. (2005 Aug 1). Microglia function in brain tumors. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH*, 81(3), 447-55.
- 107.** Yang, I., Han, S. J., Kaur, G., Crane, C., Parsa, A. T. (2010 Jan). The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *JOURNAL OF CLINICAL NEUROSCIENCE*, 17(1), 6-10.
- 108.** Yi Liang, L., Xiao, H., Xu, M., Ye, X., Hu, J., Li, F., Li, M., Luo, C., Yu, S., Bian, X., Feng, H. (2011 Mar). Glioma-initiating cells: a predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma. *JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY*, 232(1-2), 75-2.
- 109.** Zhai, H., Heppner, F. L., Tsirka, S. E. (2011 Mar). Microglia/macrophages promote glioma progression. *GLIA*, 59(3), 472-85.

VIII. Anexos

Anexo 1. Dados clínicos referentes aos casos da amostra.

Caso	Idade	Género	Data da cirurgia	Localização da lesão	Diagnóstico
1	16	F	23.08.2010	Occipital	Astrocitoma pilocítico
2	35	M	11.03.2010	Cerebelar	Astrocitoma pilocítico
3	13	M	17.12.2009	Parietal	Astrocitoma pilocítico
4	3	F	13.10.2009	Cerebelar	Astrocitoma pilocítico
5	12	M	26.04.2007	Cerebelar	Astrocitoma pilocítico
6	25	F	15.12.2006	Cerebelar	Astrocitoma pilocítico
7	11	M	19.05.2005	Cerebelar	Astrocitoma pilocítico
8	11	M	09.04.2002	Cerebelar	Astrocitoma pilocítico
9	36	M	25.04.1999	Parietal	Astrocitoma pilocítico
10	27	F	02.06.1999	IV ventrículo	Astrocitoma pilocítico
11	47	F	11.01.2013	Frontal	Astrocitoma difuso
12	59	F	01.08.2012	Corpo caloso	Astrocitoma difuso
13	33	M	16.11.2011	Temporal	Astrocitoma difuso
14	12	F	15.10.2011	Parietal	Astrocitoma difuso
15	46	M	30.11.2009	Temporal	Astrocitoma difuso
16	58	M	24.06.2009	Temporal	Astrocitoma difuso
17	26	M	22.11.2005	Frontal	Astrocitoma difuso
18	42	M	13.03.2003	Parietal	Astrocitoma difuso
19	29	F	18.03.2003	Occipital	Astrocitoma difuso
20	34	F	26.10.1998	Temporal	Astrocitoma difuso
21	38	M	7.11.2011	Frontal	Astrocitoma anaplásico
22	47	F	30.12.2009	Frontal	Astrocitoma anaplásico
23	32	M	16.06.2009	Frontal	Astrocitoma anaplásico
24	29	M	13.01.2009	Frontal	Astrocitoma anaplásico
25	60	F	01.09.2008	Frontal	Astrocitoma anaplásico
26	30	F	22.08.2002	Temporal	Astrocitoma anaplásico
27	26	F	10.07.2002	Temporal	Astrocitoma anaplásico
28	48	F	25.01.2002	Fronto-insular	Astrocitoma anaplásico
29	60	F	04.01.2000	Frontal	Astrocitoma anaplásico
30	41	M	07.07.1999	Parietal	Astrocitoma anaplásico
31	56	F	21.12.2012	Frontal	GBM

32	45	M	28.11.2012	Frontal	GBM
33	67	M	27.09.2012	Parietal	GBM
34	70	M	12.09.2012	Temporal	GBM
35	65	M	22.08.2012	Occipital	GBM
36	27	M	03.08.2012	Frontal	GBM
37	44	M	13.07.2012	Temporal	GBM
38	83	M	24.02.2012	Cerebelar	GBM
39	71	F	21.07.2011	Temporal	GBM
40	76	M	15.06.2011	Parietal	GBM
41	58	M	12.12.2012	Temporal	Oligodendroglioma baixo grau
42	35	F	04.06.2012	Frontal	Oligodendroglioma baixo grau
43	38	M	16.05.2012	Frontal	Oligodendroglioma baixo grau
44	32	F	06.02.2012	Frontal	Oligodendroglioma baixo grau
45	68	M	04.10.2011	Frontal	Oligodendroglioma baixo grau
46	43	F	13.07.2011	Frontal	Oligodendroglioma baixo grau
47	30	M	26.01.2011	Frontal	Oligodendroglioma baixo grau
48	59	F	29.04.2010	Temporal	Oligodendroglioma baixo grau
49	1	M	17.08.2009	Temporal	Oligodendroglioma baixo grau
50	47	M	13.08.2009	Frontal	Oligodendroglioma baixo grau
51	65	F	11.10.2012	Temporal	Oligodendroglioma anaplásico
52	54	M	28.08.2012	Temporal	Oligodendroglioma anaplásico
53	70	F	27.06.2012	Temporal	Oligodendroglioma anaplásico
54	68	M	20.06.2012	Frontal	Oligodendroglioma anaplásico
55	72	F	18.06.2012	Temporal	Oligodendroglioma anaplásico
56	51	M	11.06.2012	Frontal	Oligodendroglioma anaplásico
57	78	M	16.04.2012	Temporal	Oligodendroglioma anaplásico
58	53	F	29.09.2011	Temporal	Oligodendroglioma anaplásico
59	33	F	23.05.2011	Frontal	Oligodendroglioma anaplásico
60	63	F	10.05.2011	Temporal	Oligodendroglioma anaplásico
61	30	M	03.09.2012	Intramedular	Ependimoma baixo grau
62	51	M	10.02.2011	Cauda equina	Ependimoma baixo grau
63	24	M	09.07.2009	IV ventrículo	Ependimoma baixo grau
64	42	F	09.03.2008	Intramedular	Ependimoma baixo grau
65	15	F	11.09.2008	Ventrículo lateral	Ependimoma baixo grau
66	20	M	09.06.2008	Intramedular	Ependimoma baixo grau
67	57	M	14.04.2008	Intramedular	Ependimoma baixo grau
68	45	F	04.12.2006	Intramedular	Ependimoma baixo grau
69	62	M	23.10.2006	Intramedular	Ependimoma baixo grau

70	60	F	19.10.2006	Extramedular	Ependimoma baixo grau
71	10	M	30.03.2012	Cerebelar	Ependimoma anaplásico
72	3	M	25.06.2011	Frontal	Ependimoma anaplásico
73	6	F	18.03.2011	Intramedular	Ependimoma anaplásico
74	6	F	05.08.2010	Ventrículo lateral	Ependimoma anaplásico
75	2	F	19.07.2010	Frontal	Ependimoma anaplásico
76	6	F	15.07.2010	IV ventrículo	Ependimoma anaplásico
77	4	F	11.02.2010	IV ventrículo	Ependimoma anaplásico
78	9	F	09.08.2007	IV ventrículo	Ependimoma anaplásico
79	1	M	23.04.2007	IV ventrículo	Ependimoma anaplásico
80	4	M	02.02.2006	IV ventrículo	Ependimoma anaplásico

Anexo 2. Dados clínicos referentes aos controlos da amostra.

Caso	Idade	Género	Data da cirurgia	Localização	Diagnóstico hsiológico
1	35	F	20.04.2012	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
2	57	M	09.09.2011	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
3	29	F	09.07.2010	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
4	36	M	05.11.2010	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
5	39	F	10.09.2010	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
6	50	M	31.07.2009	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
7	32	F	24.06.2009	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
8	37	F	17.04.2009	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
9	25	M	27.02.2009	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
10	38	M	17.12.2008	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
11	50	F	05.12.2008	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
12	45	F	31.10.2008	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
13	17	F	11.07.2008	Frontal	Cirurgia de epilepsia
14	46	F	07.12.2005	Hipocampo	Cirurgia de epilepsia
15	76	M	02.11.2005	Temporal	Cirurgia de epilepsia
16	60	F	09.12.2009	Cerebelar	Metástase
17	63	M	20.10.2009	Parietal	Metástase
18	70	M	19.10.2009	Frontal	Metástase
19	40	F	06.10.2009	Temporal	Metástase
20	52	M	21.08.2009	Frontal	Metástase
21	55	F	14.08.2009	Medular	Metástase
22	71	F	08.07.2009	Cerebelar	Metástase
23	70	F	30.04.2008	Temporal	Metástase
24	70	F	09.04.2008	Temporal	Metástase
25	47	F	11.02.2008	Frontal	Metástase
26	61	F	27.04.2012	IV ventrículo	Hemangioblastoma
27	62	M	03.04.2012	Cerebelar	Hemangioblastoma
28	39	M	02.04.2012	Intramedular	Hemangioblastoma
29	67	F	08.08.2011	Cerebelar	Hemangioblastoma
30	53	F	20.06.2011	Cerebelar	Hemangioblastoma
31	23	F	13.01.2011	Cerebelar	Hemangioblastoma
32	83	F	25.11.2010	Cerebelar	Hemangioblastoma
33	45	M	02.06.2010	Cerebelar	Hemangioblastoma

34	32	M	05.04.2010	Cerebelar	Hemangioblastoma
35	62	M	15.03.2010	Cerebelar	Hemangioblastoma
36	29	F	15.02.2010	Cerebelar	Hemangioblastoma
37	40	F	16.07.2009	Cerebelar	Hemangioblastoma
38	74	F	08.08.2008	Cerebelar	Hemangioblastoma
39	62	F	26.05.2008	Cerebelar	Hemangioblastoma
40	11	M	20.08.2012	IV ventrículo	Meduloblastoma
41	7	M	26.05.2011	Cerebelar	Meduloblastoma
42	42	M	24.11.2010	Cerebelar	Meduloblastoma
43	12	M	06.05.2010	IV ventrículo	Meduloblastoma
44	7	M	22.02.2010	Cerebelar	Meduloblastoma
45	11	M	12.11.2009	Cerebelar	Meduloblastoma
46	42	M	19.10.2009	Cerebelar	Meduloblastoma
47	5	M	28.08.2008	Cerebelar	Meduloblastoma
48	29	M	27.02.2008	Cerebelar	Meduloblastoma
49	31	M	28.10.2009	Cerebelar	Meduloblastoma
50	8	F	02.06.2008	Cerebelar	Meduloblastoma
51	8	M	16.04.2007	Cerebelar	Meduloblastoma
52	9	M	10.07.2006	Cerebelar	Meduloblastoma